

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

**Estudios fisiológicos mediante la técnica del cultivo de raíces
"in vitro"**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Bausá Alcalde

Madrid, 2015



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5324472100

14
577.1
BAU

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DEL

CULTIVO DE RAÍCES "IN VITRO"

**Contribución al conocimiento de la forma -
ción de alcaloides en el género Nicotiana.**

b2631699x
c36066801

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
BIBLIOTECA
Nº Registro3.3.8.84.

Por MARIA BAUSA ALCALDE

ESTUDIOS FISIOLÓGICOS MEDIANTE LA TÉCNICA DEL

CULTIVO DE RAÍCES "IN VITRO"

Contribución al conocimiento de la forma- ción de alcaloides en el género Nicotiana.

Por María Bensa Alcalde.

XXXX XXXXX

INTRODUCCIÓN

Desde que por sugerencia del Prof. Bustinsa leímos los libros de Gautheret (31) y White (71) sobre el cultivo de tejidos vegetales, nos sentimos atraídos por esta clase de trabajos y pensamos dedicar a ellos nuestra actividad.

La atracción nos la producían tanto los cultivos en sí -encontrábamos sugestivo en extremo el hecho de poder mantener en plena actividad vital un fragmento escindido de un organismo superior, sustraído a su control, independizado de él hasta el punto de sobrepasar con mucho el período de vida propio de su especie- como las posibilidades de aplicación que tras ellos veíamos.

Comenzamos enseguida a trabajar hasta hacernos con su técni-

serre al que habíamos de dedicarnos especialmente aplicando este medio de trabajo a la investigación de una serie de puntos, en relación con la formación de nicotina en el tabaco, sobre los que no existen suficientes datos o los que hay son poco claros.

Empezaremos por hacer un pequeño resumen de lo que es y significa el cultivo de tejidos "in vitro" y sus posibles aplicaciones. Haremos después una relación del estado actual de los conocimientos sobre alcaloides en la planta en general y sobre la nicotina en particular, insistiendo especialmente en la influencia de los factores externos sobre su formación, tema al que dedicamos un capítulo aparte por ser el aspecto que más nos interesa en relación con nuestras investigaciones.

En la parte experimental, describiremos sumariamente la técnica general del cultivo de raíces y con mas detalle la técnica particular que hemos utilizado en las experiencias sobre Nicotiana; a continuación describiremos estas expresando los resultados obtenidos y las consecuencias que de ellos puedan derivarse.

La redacción de este trabajo la haremos pues de acuerdo con el siguiente esquema:

INTRODUCCIÓN TEÓRICA

I.- EL CULTIVO DE TEJIDOS Y SUS APLICACIONES

- 1.- El cultivo en sí.
- 2.- Las aplicaciones.

II.- LOS ALCALOIDES EN LA PLANTA Y ESPECIALMENTE EN EL TABACO

- 1.- Estado actual de los conocimientos sobre alcaloides en

**III.- INFLUENCIA DE LOS FACTORES CULTURALES Y AMBIENTALES SOBRE
EL CRECIMIENTO Y FORMACION DE ALCALOIDES EN PLANTAS DE TA-
BACO PRINCIPALMENTE.**

- 1.- Influencia de las condiciones nutritivas y ambientales
generales.
- 2.- Acción particular de los elementos nutritivos.
- 3.- Influencia del pH.

P A R T E E X P E R I M E N T A L
=====

IV.- EXPERIENCIAS QUE CONTIENE NUESTRO TRABAJO

V.- TECNICA GENERAL DEL CULTIVO DE RAICES "IN VITRO"

VI.- TECNICA PARTICULAR

- 1.- Cultivos.
- 2.- Recogida de las muestras.
- 3.- Estimación de los resultados.
- 4.- Determinación de la nicotina.
- 5.- Determinación del nitrógeno.

VII.- DESCRIPCION DE LAS EXPERIENCIAS

**VIII.- CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS RESULTADOS DE LA TOTA-
LIDAD DE LAS EXPERIENCIAS.**

NOTA BIBLIOGRAFICA.

I.- EL CULTIVO DE TEJIDOS Y SUS APLICACIONES.

1.- EL CULTIVO EN SI

El cultivo de tejidos "in vitro", es decir, la conservación fuera de un organismo de tejidos, órganos y aún células aisladas, que colocados en medio nutritivo conveniente y en condiciones ambientales adecuadas viven, crecen y se multiplican, es una realidad que se remonta al año 1907, actualizada por numerosos e importantes trabajos recientes en el campo vegetal.

Es bien conocido el caso del fragmento de corazón de pollo que mantenía vivo Carrel al cabo de más de 30 años de explantado. También Gautheret conserva tejidos de zanahoria que cuentan casi 20 años de edad.

Las células separadas de un organismo superior mantienen en unos casos las características del tejido u órgano a que pertenecieron —células animales en general—; en otras ocasiones se dediferencian dando masas de células sin organización de orden superior a ellas mismas o solo con un principio de esta (tejidos vegetales). El aspecto de un cultivo de tejido vegetal, aunque sea esa masa celular indiferenciada, es característico para cada planta (Gautheret, 31 y 33).

El hecho biológico⁶⁶ que significa el cultivo de tejidos está fuera de dudas: el hombre ha logrado liberar a las células del control de su propio organismo, independizarlas de él.

Pero este hecho biológico⁶⁷ y hasta filosóficamente trascendente, ha superado la fase de interés puramente teórico y con finalidad en si mismo para pasar a ser un medio, un instrumento mas de que dispone el hombre de ciencia, para acercarse a problemas de

es proceso más delicado que cultivar una bacteria o un moho, sumando en muchos aspectos las técnicas sean semejantes. La escisión del fragmento u órgano supone una acción traumática que no sufren la bacteria o el hongo que se ponen en cultivo.

Requiere el cultivo de tejidos asepsia, condiciones físicas muy precisas (tº, humedad, aireamiento, pH, etc.); un medio nutritivo adecuado y liberar a las células de los productos catabólicos que se van acumulando en el medio.

El averiguar las necesidades nutritivas de las células fue acaso el proceso más difícil para la consecución de los cultivos de tejidos vegetales. En los de animales fue relativamente fácil; se aprovecharon como medio nutritivo los humores orgánicos que bañan a toda célula de un animal superior y con los que realiza los cambios metabólicos y así los primeros cultivos se realizaron empleando plasma sanguíneo y extracto de embriones. Se intentó hacer algo semejante para las células vegetales, pero se fracasó; los jugos extraídos de varios órganos -savia bruta, savia elaborada, líquido endospermico, etc.- resultaban tóxicos para las células aisladas. Fue preciso crear un medio totalmente artificial, labor muy lenta hasta llegar a averiguar los componentes necesarios.

Fácil fue pensar en los elementos minerales que requerían las células. Pero no bastaba con estos. Faltaba algo que debía proporcionarles la planta completa. Poco a poco se llegaron a fijar las exigencias nutritivas y a saber las sustancias orgánicas que era preciso añadir a la solución de sales minerales (heteroauxinas, vitaminas, etc.)

La eliminación de los productos de desecho de un cultivo tiene enorme importancia. El ritmo del tiempo fisiológico depende de las relaciones entre las células y su medio. Esto se va modificando por la actividad celular y a su vez esa modificación revierte sobre las células en círculo vicioso. Si no se eliminan

inevitable en todo organismo al cabo de un período de tiempo más o menos largo.

Pero el ritmo de vida de un cultivo depende de la técnica empleada y tratamiento que reciba. Un fragmento de corazón de pollo cultivado en una gota de plasma sobre un porta excavado vive mucho menos que otro fragmento igual colocado en un tubo o un matraz con mayor cantidad de medio nutritivo. Un fragmento de tejido animal cultivado "in vitro" debe disponer de un volumen de líquido nutritivo unas 2000 veces superior al suyo y de una atmósfera gaseosa 10 veces mayor que el volumen del líquido para que no se envenenen sus células en corto tiempo. (La masa celular del hombre viviendo en estas condiciones necesitaría 200,000 litros de líquido nutritivo, cuando le basta a esas células con los 6 a 7 litros de sus humores internos). (Carrel, 9)

Es necesario para la conservación de un cultivo realizar renovaciones periódicas del medio; eliminar las partes viejas y necrosadas; resembrar los fragmentos más activos; en los tejidos animales, se hace a veces preciso hasta un lavado diario de sus células, etc. Todas estas operaciones son delicadas y requieren constante atención y trabajo.

Pero si se consigue con todo ello mantener prácticamente constante el medio en que viven unas células los resultados son sorprendentes: se habrá logrado parar el tiempo, es decir, que se conserve invariable la edad fisiológica que tenía aquel tejido en el momento inicial del cultivo, pudiendo mantenerse sus células eternamente jóvenes. (Fibroblastos de Carrel; tejidos de zanahoria de Gautherot. Nosotros mismos mantenemos cultivos de raíces de berenjena y tabaco desde hace 4 años).

Contra lo que pudiéramos suponer por la idea que tenemos del organismo animal y vegetal, se logró antes el cultivo de tejidos de animales. El retraso para la consecución del de plantas se debió, en parte, a las características de los vegetales frente a

Entre aquellas características están: 1ª) La de carecer las plantas de un medio interno equivalente al de los animales, lo que dificultó, como hemos visto, al conseguir el medio nutritivo adecuado. 2ª) El poseer las células vegetales una fuerte membrana de secreción que hace más difícil la separación del fragmento de su organismo correspondiente, haciendo que los efectos traumáticos sean mas intensos; también dificulta el que en la masa de un tejido puedan llegar al protoplasma las sustancias nutritivas. 3ª) El que las células vegetales maduras no sean, en general, capaces de multiplicarse.

Esto último fué el mayor inconveniente, porque no pensó en ello Haberlandt cuando intentó el cultivo de células vegetales aisladas, lo cual hizo utilizando las de parénquimas diversos, e influido por la gran personalidad de este sabio, al mismo tipo de tejidos se dirigieron los que le siguieron después. Hasta que en 1922, Kotte, en Alemania, y Robbins, en E.E. U.U., pensaron en cultivar células meristemáticas, no se resolvió el problema.

Utilizaron estos investigadores meristemas radiculares y consiguieron que sus células vivieran y se multiplicaran durante varios meses, diferenciándose hasta dar raíces completas. White, en 1934 (67) consiguió que esas raíces vivieran indefinidamente.

Se había logrado así el cultivo de un órgano vegetal aislado. Todavía no el de un tejido puro. Esto fué Gautheret quien lo resolvió, en el mismo año 1934, cultivando cambium de sauce y de raíz de zanahoria (26) consiguiendo mas tarde, en 1939, su duración indefinida al mismo tiempo que Habecourt y White (28, 56 y 70).

En el periodo que media entre los trabajos de Haberlandt (1902) y los de Kotte y Robbins (1922) surgió el cultivo de tejidos animales iniciado por Harrison quien, en 1907, consiguió ver como un fragmento de tubo neural de rana, colocado sobre una

trabajos por Burrows y Carrel, realizaron una serie de investigaciones hasta dejar sentada Carrel, ya en 1912, la técnica para el cultivo de tejidos animales, que, con ligeras modificaciones posteriores de su parte (8), es casi la que se sigue hoy día.

Burrows, Carrel (a quien se considera el verdadero creador) Balcer, Ebeling, Fischer, Fiedler, Demuth, Drew, matrimonio Lewis, etc., son nombres bien conocidos en el campo de la biología animal que han aportado interesantes datos sobre estos estudios, así como en el de los vegetales lo han hecho ^{Kotte} Kotte, Robbins, Bonner, White, Gautheret, Bobecourt, Ball, Loo, Gioelli, Galligar, Duhamet, Coris y Morol, entre otros.

^{cultivo)}
El de tejidos animales, como más antiguo, se ha aplicado desde hace tiempo al estudio de los problemas biológicos mas diversos y ha sido adoptado como técnica corriente en los grandes centros de investigación, en los que se cuenta con instalaciones apropiadas. El de tejidos vegetales, más joven, no ha sido de utilización tan general, aunque ha prestado servicios importantes y se muestra más prometedor que el de animales. El medio nutritivo sintético que se utiliza hoy para los órganos de tejidos de plantas, si bien fué difícil llegar a conocer que composición hubiera de tener, tiene en cambio la ventaja de que se presta mejor a variaciones experimentales que los jugos animales, muy complejos y que contienen elementos aún no perfectamente conocidos. Además, la célula vegetal en cultivo parece ser que sufre menos alteraciones funcionales que la animal.

Se han aplicado estas técnicas a estudios de Citología, Morfología, Fisiología y Patología.

Resultan muy adecuadas para la investigación de la estructura y fisiología celulares las pequeñas colonias de los cultivos animales en gota pendiente, cuya transparencia permite la observación microscópica directa de células vivas, pudiendo seguirse en ellas las modificaciones estructurales inherentes a los procesos fisiológicos, fotografiarse sus movimientos, etc. Se han llegado a descubrir con esta técnica, propiedades fisiológicas específicas que caracterizan ciertos tipos celulares: fibroblastos, células epiteliales, monocitos, células sarcomatosas, carcinomatosas, etc. habiéndose visto como cada tipo celular es identificable por sus propiedades fisiológicas tanto como por su aspecto estructural. Su modo de locomoción, textura de sus colonias, velocidad de proliferación en un medio dado, naturaleza y concentración de las sustancias necesarias para su supervivencia y proliferación, su

lieren por sus propiedades fisiológicas, pudiéndose diferenciar en cultivo, como razas distintas, los procedentes de corazón, músculos, glándula tiroides, hueso, etc. (Carrel, 9)

Surgió la idea del cultivo de células al querer comprobar cual sería el fragmento mas pequeño de un vegetal capaz de regenerar el organismo completo; porción mínima que, pensó Haborlandt, debía ser la célula. La preocupación por los problemas morfológicos creó por tanto la técnica que, a su vez, sirve hoy para el estudio de aquellos.

En cultivo de tejidos vegetales el experimentador provoca o impide a voluntad la diferenciación de tejidos y órganos. Con el empleo de heteroauxinas en unos casos, con diferencias de aireación en otros, logra Gautherot que un cultivo de tejido cambial se comporte de distinta manera, formando o no raíces, yemas, o permaneciendo como masa indiferenciada (27, 29, 30).

En otros casos se ve que no es un factor externo el que dirige la diferenciación, sino que en las distintas células existen distintas potencialidades: si se cultivan células epiteliales se organizan en membrana continua en la superficie del medio nutritivo, carácter inherente al tejido epitelial; los linfocitos, en condiciones normales flotantes en el plasma sanguíneo, no dan nunca una masa compacta sino que se dispersan por el medio; los fibroblastos forman un tejido a manera de fieltro, etc. (Carrel, 9)

También en estudios patológicos promueve muchos frutos este medio de investigación.

Algunos agentes productores de enfermedades, por ser parásitos obligados, escapaban al estudio "in vitro". Incapaces de desarrollarse en un caldo de cultivo había de hacerse su estudio sobre un ser vivo debiendo limitarse a su observación. Pues bien, se ha conseguido el desarrollo de algunos de estos agentes -virus del mosaico del tabaco (White, 68 y 69; Morol, 49); virus de la virola; oidium y mildiu de la vid (Morol, 49)- sobre tejidos cul-

tar asoquibles a la experimentación. (Takahashi ha realizado con este método estudios sobre el efecto de la luz sobre la multiplicación de los virus, 64).

La formación de las nudosidades de las leguminosas también ha sido estudiada por este medio (Lewis y Coy, 45)

Por la importancia de la enfermedad tienen también cierto valor los estudios realizados sobre el cáncer.

La situación de las células tumorales y las células en cultivo "in vitro" presenta alguna semejanza. En ambos casos se trata de células pertenecientes a un organismo superior que han alcanzado vida autónoma.

Los estudios en relación con el cáncer se iniciaron con el cultivo simultáneo comparativo de tejidos animales cancerosos y normales. Este pudiera ser un camino, el mas directo. Pero también se ha intentado seguir otro, menos directo aunque acaso más fructífero, trabajando sobre tejidos vegetales.

De entre las diversas neoplasias que se observan en los vegetales, las llamadas Crown-gall son las que mas analogías parecen presentar con el cáncer animal. Si un fragmento de tumor de Crown-gall se injerta sobre una planta sana, se producen en ella varios tumores: uno, localizado en el lugar del injerto, cuyas células contienen la bacteria (Phytophthora tumefaciens) productora normal de esta neoplasia; otros secundarios, alejados de aquel, en los que no se encuentra ésta. Se considera sean originados por un proceso semejante al de la metástasis del cáncer animal. Cultivados "in vitro" tejidos de estos tumores secundarios e injertados después sobre una planta sana, hacen lugar en ella a nuevos tumores (White y Braun, 73; White, 72)

El cultivo simultáneo de tejidos de tumores secundarios de crown-gall -sin bacterias por tanto- y de tejidos normales de la misma planta ha probado que ambos son capaces de desarrollarse en el mismo medio nutritivo con la diferencia de que los tejidos nor-

obtener cultivos de tejidos que presentan algunas características de los tejidos de tumores secundarios de crown-gall. ^{Por otra parte)} En cultivos normales mantenidos durante años requiriendo el aporte de heteroauxinas, ocurre a veces que, de manera esporádica y sin que se puedan determinar las condiciones que los originan, aparecen en la superficie de algunas porciones localizadas, a manera de verrugas, de aspecto diferente al resto de la masa celular, las cuales, sembradas, dan lugar a cultivos de aspecto y características análogas a los de tejidos de tumores secundarios de crown-gall. Como éstos capaces de seguir viviendo y proliferando sin ulterior adición de heteroauxinas (porque las sintetizan sus células) y como éstos, capaces también de provocar tumores si se injertan sobre una planta sana, incluso en plantas que no los presentan de manera espontánea.

¿Asistimos aquí al proceso de transformación de células sanas en tumorales? ¿Será posible llegar a averiguar mediante el cultivo de tejidos, cómo y porque tiene lugar esa transformación?

El cultivo de tejidos de crown-gall ha atraído a multitud de investigadores siendo muy numerosos los trabajos publicados sobre este tema.

En cuanto al campo de la Fisiología ha tomado y tiene también muchas aplicaciones esta técnica.

Al aislar un órgano o tejido se suprimen correlaciones e interrelaciones con el resto del organismo y ^{es posible que)} (se haga más asequible un problema fisiológico si se estudia en células aisladas.

Lo primero que se ha investigado han sido las necesidades nutritivas de las células; se han visto también relaciones entre morfología y fisiología (acción de heteroauxinas, vitaminas, colchicina, etc.); influencia del pH; polaridad en los tejidos; diferenciación y dediferenciación de células, etc.

Los cultivos de tejidos vegetales se prestan mejor a estudios

a las pequeñas colonias de cultivos de tejidos animales.

No son tan detractores de esta técnica. Ciertos autores estiman que las condiciones del cultivo "in vitro" son tan diferentes de las normales que deben modificar profundamente las propiedades fisiológicas de las células. Pero parece se ha demostrado que esas modificaciones son muy pequeñas, al menos, para las células vegetales.

En cuanto a relación con el problema objeto de nuestra tesis, el cultivo de tejidos —de raíces especialmente— ha venido a unirse modernamente —así como el empleo de elementos isótopos radioactivos— a las técnicas clásicas de investigación de alcaloides en la planta:

Experiencias de campo, realizadas desde antiguo; estudios citoquímicos e histoquímicos; hibridaciones; injertos, que tan fructíferos han sido; experiencias de todo tipo con órganos aislados —hojas o tallos— conservados durante un corto tiempo en soluciones nutritivas; enraizamiento de hojas y esquejes, etc.

Aún se han realizado pocas observaciones sobre alcaloides con la técnica del cultivo "in vitro", pero ofrece muchas perspectivas y es posible que mediante su empleo puedan eliminarse algunas de las dificultades que se encuentran en otras técnicas de estudio:

El material sobre el que se experimenta puede ser totalmente homogéneo si se cuida de que proceda de la misma semilla.

Los individuos de que conste una unidad experimental pueden ser tan numerosos como queramos pues podemos poner cuantas repeticiones deseemos en condiciones equivalentes; el "muestreo" con esto no ofrecerá dificultades y los resultados tendrán prácticamente valor estadístico.

En el cultivo de raíces será fácil hacer llegar a los tejidos las sustancias cuyo efecto se desee observar, ya que la raíz es órgano absorbente por excelencia y no tendremos más que adicionarlas al medio de cultivo.

Toda la masa de tejidos que rodea al ápice de una explante-
cia se habrá formado dentro de las condiciones que le hayamos pro-
porcionado. La masa inicial de un cultivo de raíces, si se
comienza con un ápice radicular aislado, es despreciable frente a
la masa formada.

No habrá que temer la interferencia de microorganismos puesto
que estos cultivos han de realizarse en condiciones asépticas.

Presenta, en cambio, el inconveniente de una posible diferen-
te reacción de las raíces aisladas frente a la que presentaría la
planta completa.

Con esta técnica han trabajado sobre alcaloides según nuestras
referencias:

Dawson (17); el primero que la aplicó a estos estudios. Cultiva-
ndo raíces de Nicotiana Tabacum L. demostró concluyentemente
que la raíz formaba nicotina en esas condiciones.

Mothes y Kretsch (55), que estudiaron la formación de alcaloi-
dos en raíces de Lupinus angustifolius, comprobando que también
en esta planta los formaban las raíces aisladas.

Lama (40) que dirigió sus trabajos a las raíces de Atropa
belladonna. Demostró que formaba atropina y estudió además la in-
fluencia de la disminución de los elementos minerales del medio
nutritivo sobre su proporción.

Nosotros la hemos utilizado para ver la influencia de varios
factores nutritivos y químicos sobre la formación de nicotina en
Nicotiana Tabacum L. y para comprobar si se forman también alca-
loides en las mismas condiciones en las de otras especies de Nico-
tiana: N. glauca Griseb. y N. sylvestris Speng. et Com.

II.- LOS ALCALOIDES EN LA PLANTA Y ESPECIALMENTE

EN EL TABACO.

1.- ESTADO ACTUAL DE LOS CONOCIMIENTOS **SOBRE ALCALOIDES EN GENERAL.**

El grupo heterogéneo de compuestos que conocemos con el nombre de alcaloides ha interesado desde antiguo a los investigadores por encerrar sustancias activas con acción fisiológica energética sobre el organismo humano y animal en general y desde este punto de vista farmacológico han sido bien estudiados muchos de sus componentes. Mas sobre el aspecto de su valor fisiológico para la planta, sólo se han hecho estudios recientemente y no es mucho lo que de esto se sabe.

Esto abandono se debió, en parte, a que se les consideró de poca importancia para la fisiología del vegetal y se estimó que su conocimiento poco podría aportar para la comprensión del metabolismo de la planta; en parte, a que son sustancias cuyo estudio es difícil en este sentido.

Predominó la idea de que los alcaloides eran sustancias de excreción -idea que encuentra datos a su favor en algunos hechos de observación que después señalaremos- más otros de estos hechos sirven de base para asignarles un papel en el metabolismo del vegetal, tendencia que es la mas aceptada hoy día.

Distribución geográfica de las plantas productoras de alcaloides.

En todos los climas y latitudes se desarrollan plantas alcaloide-formadoras. Prácticamente existen en todo "habitat" donde haya plantas vasculares.

cas. Conforme se van investigando se descubren en mas.

En cuanto al comportamiento de los miembros de una familia tenemos algunas en las que todas sus especies los contienen (Papaveráceas) otras en las que raramente en alguna especie aislada los hay (las Quenopodiáceas, Compuestas, Borragináceas y Convolvuláceas se encuentran en este caso) pero la mayoría ocupan una posición intermedia entre aquellos dos extremos: todas las especies de un género, o aún de géneros muy próximos dentro de la familia, se comportan de la misma manera, produciéndoles o no. Así ocurre por ejemplo con las Ranunculáceas: todas las especies de *Aconitum* y *Delphinium* los elaboran, mientras no lo hacen las de otros géneros de la misma familia mas alejados de aquellos.

Respecto a relaciones entre la composición química de los alcaloides de las diversas plantas, parece haberse observado que los producidos por géneros afines son muy semejantes (en *Delphinium* y *Aconitum* se encuentra licoctyna) mientras que pueden diferir marcadamente en su tipo nuclear los formados por géneros cuya relación dentro de la familia sea remota (aconitinas de *Aconitum* e hidrastina de *Hydrastis*).

En general, parece observarse, que, cuanto más estrechas son las relaciones entre dos plantas mas afinidad hay entre sus alcaloides y se ha intentado aplicar su distribución al estudio sistemático de los vegetales.

Parece han resultado útiles en alguna ocasión para señalar afinidades y diferencias de las especies dentro de un género. Por ejemplo sirvió el estudio de los alcaloides de las especies de *Corydalis* para situar a *Corydalis sempervirens* (L.) Pers. en la sección que le correspondía dentro del género.

La distribución de alcaloides en relación con grupos taxonómicos de orden superior no es ^(tan) clara. Es difícil explicar por ejemplo la presencia de berberina en plantas de seis familias diferentes, tres de las cuales pertenecen a órdenes que, para Hutchinson (41)

eseción de un grupo primitivo de Arqueopteridales del que derivarían, según él, todas las plantas con flores.

También la hordenina la encontramos en plantas entre las que no hallamos relación ninguna: Gramíneas y Cactáceas (se ha hallado en Anhalonium fissuratum Engl.)

Mayor dificultad encontraríamos aún si intentáramos justificar sistemáticamente la presencia de nicotina en plantas taxonómicamente tan alejadas como Solanáceas y Lycopodiales o Equisetales. (Manske en "The Alkaloids".- Vol. I (..))

Distribución en la planta.

En las plantas perennes o bienales, durante el primer año de vida se encuentran distribuidos regularmente por toda la planta, localizándose de preferencia en algunos órganos a medida que avanza la edad. La corteza de muchas plantas arbóreas suele ser rica en alcaloides (Cinchona); asimismo lo es la corteza de las raíces viejas de agavecho, que contienen hasta un 10% de barberina. En Scilla, Aconitum y Delphinium, se acumulan más en las partes aéreas.

En las anuales no parece haya una localización especial, pero sí varía mucho el contenido en los diversos órganos durante el periodo de crecimiento.

Si una planta elabora varios alcaloides, la razón de estos no es la misma en todos los estados de su desarrollo. Esto explica los diversos datos dados por distintos autores en cuanto a proporción de alcaloides principales y secundarios en la misma planta.

Existe también una variación individual para el contenido alcaloídico bastante acusada (Manske, "The Alkaloids").

(..) "The Alkaloids" obra de conjunto sobre química y fisiología de alcaloides, realizada con la colaboración de varios autores y editada por Manske y Holmes.

Academic Press Inc., New York, 1950-52.

De ella nos hemos servido principalmente para la parte general de alcaloides.

Las los que hicieron los primeros trabajos, estudiando numerosas plantas a lo largo de 20 años, investigando individualmente todos los tejidos y órganos. Examinaron principalmente las especies pertenecientes a las Solanáceas.

Parece que halló Errera 4 tendencias en la distribución:

- 1ª.- En tejidos muy activos (bien por encontrarse en fase de crecimiento -meristemas apicales, cambium cicatricial- o en intensivo metabolismo como secreción activa).
- 2ª.- Tejidos superficiales (epidermis, capa pilífera, pelos de las partes aéreas).
- 3ª.- Vainas vasculares y otros parénquimas próximos o penetrantes en el tejido vascular.
- 4ª.- Vasos laticíferos cuando existen.

En los tejidos muertos parece que no se acumulan. Cuando se encuentran en la corteza (quinina) están en las células vivas que haya en ella.

El óvulo antes de la fecundación tiene siempre gran cantidad de alcaloides. En la semilla madura puede ocurrir: que no haya ninguno; que haya muy pocos, en cuyo caso se encuentran en los tegumentos, o que haya muchos y estén en los tejidos de reserva (albumen o cotiledones). Por tanto, durante el proceso de formación de la semilla deben sufrir cambios, pudiendo desaparecer o aumentar.

En la célula se encuentran en forma de sales disueltas en la vacuola central (pueden también estar formando otros compuestos como ocurre con la nicotina que forma dos glucósidos). En algunas drogas secas se hallan en las membranas celulares; pero este parece que es efecto "post mortem".

Las células, cuando acumulan alcaloides se encuentran en rápida vacuolización. Los detallados estudios de Chase sobre tabaco parece establecieron una relación entre la licuación de los granos de alcapóna y su aparición en la plántula. En la célula recién formada no existen; aparecen con la vacuolización y se acumulan durante

dures en unas aumentan y disminuyen en otras. (James en "The Alkaloids". Vol. I).

Lugar de formación

La elaboración de alcaloides no es privativa de ninguna clase de órganos. Se forman en todos pero varía el lugar de formación de unas especies a otras.

Lo mas general es que sea ^{en} la raíz donde asienten su síntesis pero en otros casos es en las hojas (quinina, norticoquina) e indistintamente en raíz y brote (anabasina). También en algunos casos, los constituyentes de un alcaloide pueden ser formados en diferentes partes de la planta: la norticoquina se forma en las hojas a expensas de la nicotina originada en las raíces (Dawson 18 y 20)

Circulación

La circulación por vía xilemática parece demostrada.

Surgió la idea de las observaciones sobre injertos entre plantas formadoras y no formadoras de alcaloides:

Injertos de tomate sobre tabaco, belladona y estramonio, contenían en sus frutos cantidades considerables de los alcaloides correspondientes.

En los injertos recíprocos disminuyen o al menos no los acumula el injerto, y no los presenta, o si los contiene es en muy pequeña cantidad, el patrón. (Bibliografía sobre estos trabajos en James en "The Alkaloids").

La observación de alcaloides en la savia que fluía de tocones de plantas cortadas de tabaco (Dawson 1941), belladona (Cromwell 1944) y estramonio (Peacock, Leyerle y Dawson 1944, James 1949) confirmó la idea del transporte por vía ascendente. (Citados todos de James en "The Alkal.")

No se sabe aún con certeza si existe o no una circulación en sentido contrario.

en hojas aisladas de tabaco (16).

La acumulación en la base de raíces jóvenes formadas sobre esquejes de belladona enraizadas en arena, la cual sugiere su transporte allí desde el tallo, ya que el sitio donde normalmente aparecen en la raíz es el ápice.

La disminución en injertos de plantas productoras sobre no productoras y su aparición en estas, aunque sea en pequeña cantidad, con acumulación en los tejidos próximos al punto de unión.

La disminución de su porcentaje en hojas senescentes (hecho de observación general).

Para comprobar si cuanto esto ocurría se debía a que los alcaloides emigraron de la hoja al tallo, Mothes en el tabaco y Weever y Van Oort para *Cinchona succirubra* (citados ambos de James (1)), realizaron la experiencia de separar medias hojas y dejar unidas al tallo las otras medias, para analizar al cabo de cierto tiempo -6 ó 7 días Mothes; 12 horas Weever y Oort- ambas mitades.

Weever y Oort hallan que han aumentado en la mitad separada de la planta y se mantienen constantes en la que está unida. Deducen que ha habido traslocación, ya que el alcaloide en *Cinchona* se forma en las hojas y desapareció la cantidad que debieron formar en ^{ese} tiempo las unidas al tallo. Mothes no encontró variación con relación a la cantidad inicial en ninguna de las dos mitades, de donde dedujo que no hubo traslocación.

James (2) estima que de la experiencia de Mothes no se puede sacar la consecuencia de que hubiera o no traslocación. Evidentemente, si hay un transporte de nicotina a las hojas por vía xilemática, para que su cantidad en estas permaneciera constante hubieran sido precisa una circulación equivalente hacia fuera de la hoja. Cree James, que habiendo estado las plantas de Mothes en la oscuridad la transpiración habría sido subnormal y es posible que no hubiera habido traslado por vía ascendente en esas condiciones.

trucción "in situ" y en general, que todos los indicios de aquella podrían explicarse por destrucciones y resíntesis locales a manera de lo que ocurre con proteínas y polisacáridos, aunque considera que esto parece químicamente improbable.

que hay desaparición de alcaloides en hojas aisladas del tallo ha sido probado para belladona y parece ser que también para tabaco (Mothes 53). En estos casos no cabe hablar de transporte al tallo; la desaparición ha debido ocurrir necesariamente por destrucción.

Para los fenómenos observados en injertos también encuentra James explicación sin necesidad de admitir nin una circulación: El metabolismo del injerto probablemente se modificará bajo la influencia del patrón. El injerto de planta formadora sobre no formadora dejaría de acumular alcaloides, bien porque no los recibiera ahora de las raíces, bien porque sobre raíces extrañas no pudiera él formarlos. Es admisible esta última suposición, aún cuando los hechos probados de la savia de tocones y las raíces en cultivo "in vitro" hayan confirmado la primera. Parece en cambio muy difícil admitir el que la fisiología de un injerto no formador se modifique hasta el punto de producir alcaloides por influencia de su patrón.

En resumen, la circulación xilemática parece definitivamente aceptada, aún cuando se encuentre el reparo para considerarla universal, de que los alcaloides para los que se ha demostrado son bien solubles, pero que existen otros demasiado insolubles para sufrir traslocación. Los conocimientos a favor o en contra de una circulación por las células vivas de la planta no pueden llevar a admitirla o rechazarla concluyentemente.

Origen y significación de los alcaloides.

Los alcaloides han de formarse a partir de sustancias nitrogenadas mas sencillas. Su formación implica una serie de reacciones

complejos:

Las sustancias nitrogenadas que han de servir de base para la síntesis de alcaloides bien pudieran proceder de la desintegración de albuminoides o, directamente, de los primeros pasos de la asimilación del N mineral.

Se ha discutido a este respecto si la formación de alcaloides habría de implicar necesariamente destrucción previa de proteínas o no y cual sería el papel que pudieran tener en el metabolismo general del N:

Weevers en semillas de Ricinus Communis germinadas en la oscuridad y James en hojas aisladas de Atropa belladonna sumergidas en una solución de azúcar, comprobaron, que, a la degradación de proteínas acompañaba formación de alcaloides. Chaze observó que la ^{aparición} ~~aparición~~ de nicotina en embriones de Nicotiana iba acompañada por licuación de los granos de aleurona. En los meristemos se forman simultáneamente protidos y alcaloides. Deleane y Vladescu (citados de Serrano, 63) y también este autor, comprueban que marchan paralelas las curvas de albuminoides y nicotina a lo largo del desarrollo de plantas de tabaco, observando un descenso de albuminoides que coincide con el de alcaloides que tiene lugar próximo a la floración. En la germinación de semillas con alcaloides en los tejidos de reserva, se los ve desaparecer a la vez que se forman proteínas en los meristemos del embrión.

De todo lo expuesto se deduce que existen indicios que lo mismo pueden hacer admitir que deriven de la degradación de albuminoides o que se formen simultáneamente con ellos o aún que pueden servir ellos mismos de base para la formación de protidos. Probablemente ocurran todos estos casos. Su formación sólo representaría un camino lateral que puede tomar el N en algún caso y que, de todas formas, siendo pequeño el porcentaje total que va a alcaloides (no es tan pequeño en nuestras raíces de tabaco donde en algunas variantes experimentales llega a alcanzar el 19,7% del

El mecanismo metabólico de una planta alcaloide formadora probablemente diferirá poco del de otra que no lo sea. A veces consiste solamente en la presencia o la falta de una enzima que catalice la reacción secundaria que llevaría al N hacia alcaloides. Las razones por las que unas plantas los forman y otras no, se desconocen (James, 1).

Se discutió en tiempos si una vez formados los alcaloides eran irreversibles como la celulosa. Hoy hay clara evidencia de que no es así, habiéndose comprobado su reversibilidad en muchos casos (Ya hemos hecho alusión a que esto ocurría para la nicotina; se sabe que también pasa al menos para la lupenina, atropina y cafeína).

En este hecho se han apoyado los investigadores para considerarles sustancias de reserva, es decir, acumulaciones temporales de elementos capaces de volver a la circulación metabólica. Sería preciso comprobar para esto, no solo que varía su proporción en la planta, sino que son utilizados, bien sea para ulteriores síntesis o bien para proporcionar energía. En este sentido observó Weaver que en hojas aisladas de Ilex paraguariensis aumentaba la cantidad absoluta de cafeína cuando estaban en la oscuridad y disminuía con la luz; dedujo que era utilizada para ulteriores síntesis. Clatrian observó en cambio que cuando en la maduración de las cápsulas de adonidora se descomponen los alcaloides, disminuyen también las proteínas. En las plantas senescentes la destrucción de alcaloides va acompañada de la de todas las sustancias. Opina James que es difícil suponer que en estas circunstancias contribuyen a resistir ninguna pero no es improbable que aporten su pizquita de energía en momentos en que no le sobrá a la planta.

Tampoco es improbable el que los elementos de su descomposición entren en la síntesis protéica en las semillas que los contienen en los tejidos de reserva, aunque el aporte de N que esto suponga no pueda tener mucha importancia.

difieren esencialmente de los productos de excreción de los animales no sólo en que son retenidos dentro del organismo, sino en que son el producto final de una cadena de reacciones anabólicas complejas. La única ventaja de considerarlos productos de excreción es que esto no implicaría el que su formación hubiera de tener ulteriores consecuencias para la planta.

A favor de esta idea puede estar el hecho de que el 90% o mas de especies viven muy bien sin alcaloides, e incluso, las que normalmente los sintetizan, no presentan anomalías evidentes cuando de ellos se ven privadas, como ocurre cuando se injertan sobre una planta no productora. En cambio, en los injertos reciprocos, su presencia anormal en el injerto no formador no parece tampoco afectarle mucho. Es posible que los frutos del tomate injertado sobre belladona encierran atropina en proporción tal como para que resulte tóxico al comérselos, sin que la planta sufra, al parecer, ningún daño.

Considera James que puesto que la acción sobre el organismo animal tiene lugar al actuar sobre un tejido tan especializado como es el nervioso -que no tiene paralelo en los vegetales- sería inútil buscar en estos una reacción tan violenta, pero que esto no quiero decir que no exista otra menos visible.

Si no se consideran sustancias de desecho y no se admite que tengan gran importancia para el metabolismo general han creído preciso ciertos autores buscarles alguna significación y así se ha pensado si pudieran servir:

12 Como protección

Al observar Herrera que se concentraban frecuentemente en los tejidos periféricos pensó si pudieran estar destinados a servir como protección contra los animales herbívoros. Pero la toxicidad de los alcaloides es muy específica. Muchos herbívoros pueden comer grandes cantidades de belladona, de la cual, unos cuantos

nicotina es un poderoso insecticida mientras que la estricnina y otros alcaloides tienen poco efecto sobre los insectos.

Como fungicidas tampoco parece sean de gran valor. Muchos mohos se desarrollan sobre las bayas e plántulas de belladona; *Phytophthora* vive tan bien sobre *Nicotiana* como sobre el tomate o la patata. (Nuestros cultivos de raíces de *N. tabacum* se ven frecuentemente invadidos por mohos).

No es posible en consecuencia asignarles ningún papel protector contra el ataque de plantas o animales.

2ª Desintoxicación

También se sugiere la posibilidad de que para su formación utilice la planta sustancias cuya acumulación pudiera causarle daños. Muy recientemente a las amidas ácidas, especialmente asparagina, se les ha asignado un papel similar para consumir el amonio libre. Puesto que parece que este cuerpo puede entrar en la formación de algunos alcaloides se piensa si pudiera tener alguna significación en este sentido. (Para nuestros cultivos de raíces de tabaco el NH_4 resultaba inadecuado y hasta tóxico. La nicotina al menos, no parece ^{por tanto} ~~entonces~~ que fuera eficaz para esta misión).

Regulación

Se ha pensado también en si los alcaloides pudieran tener algún papel entre las numerosas sustancias que regulan el desarrollo de la planta. Experiencias realizadas por Dawson (19) de suministro de nicotina a plantas de tabaco no han dado resultados evidentes de que intervengan en el control del crecimiento de este vegetal.

Se piensa también si puesto que las coenzimas y grupos prostéticos de las enzimas contienen, como los alcaloides, anillos heterocíclicos, podrían estar relacionados con aquellos o asociados a su formación. También que pudiera actuar como activadores o

seles no debe olvidarse el hecho de que la mayoría de las plantas viven sin sintetizarlos ni obtenerlos de fuentes externas, por lo cual su papel -cualquiera que sea éste- no puede ser universal, aunque es verosímil que tengan alguno, que será probablemente realizado por bases mas simples o por sustancias totalmente diferentes en otras plantas. No es fácil creer que cada variante de la enorme cantidad de síntesis realizada por las plantas esté estrechamente adaptada a una necesidad específica. Acaso los alcaloides, como estima Tschirch (citado de James, 1) solo sean "los objetos flotantes que arrojan las olas a la playa", es decir, productos secundarios, desviaciones laterales del metabolismo del N sin significación ninguna (no nos parece probable) o acaso también, dado el que dentro de los alcaloides se comprenden sustancias muy diferentes entre sí, es posible que sea también ^{sea} distinta su función en las diversas plantas y que en su día lleguen a separarse en grupos fisiológicos y químicamente diferentes.

Hoy no se conocen lo bastante como para eso.

Extensión de este alcaloide en el reino vegetal

Es muy amplia su distribución. Se encuentra no solo en las distintas especies del género *Nicotiana*, sino además en plantas entre las que difícilmente podríamos hallar ninguna relación taxonómica con aquel ni tampoco entre sí, puesto que aparece en distintas familias nada afines, e inclusive en dos Criptógamos: *Equisetum* y *Lycopodium*. Es el único alcaloide que se encuentra a la vez en Espermofitas y Pteridofitas.

Aunque en pequeñas proporciones ha sido citada en:

Asclepias syriaca L.

Equisetum arvense L.

Lycopodium flabelliforme L.

" *tristachyum* Pursh

" *clavatum* L.

" *incidulum* Michx

" *sabinaefolium* Willd.

Jedum nore L.

Cannabis sativa L. var. *indica*

Excepte en la última planta, donde fué encontrada por Preobraschensky, en 1876, habiéndose discutido este hallazgo, en las demás ha sido determinado por Lee Marion, sólo e en colaboración con Manske (números 249-258 de su bibliogr. en "The Alkal.")

En especies del género *Nicotiana* ha sido demostrada en unas 40, no apareciendo en todas ellas como alcaloide principal, pues en 16 de estas se halla en menor proporción que la nornicotina e anabacina.

La forma en que se encuentra en la naturaleza es la l-Nicotina.

El contenido alcaloídico de las especies espontáneas de Nico-

Localización de la nicotina en la planta de tabaco

Es universalmente aceptado el que las semillas de tabaco no contienen nicotina, e incluso se citan como ejemplo de órganos privados de alcaloides. Lo estiman así muchos autores: Vickery y Pucker (citados de James, 1); Frey-Wissling (25); Codounis (12). En cambio Schmid y Serrano (61) dicen que la han hallado en semillas de Nicotiana rustica.

La aparición de la nicotina en la plántula tiene lugar según Vickery y Pucker a los 9 u 11 días de comenzada la germinación. Para Codounis la aparición tiene lugar entre el 4º y 7º día, pero cuando aumenta rápidamente es entre el 7º y 11. Chaze (13) observa bastante cantidad cuando la plántula tiene de 3 - 5 mm.

Desde su aparición aumenta la cantidad total durante el crecimiento activo, habiendo una acumulación máxima a los 40 o 50 días que coincide con el máximo peso y madurez foliar, próximos a la floración (Deleane y Vladescu, citados de James: "The Alkal.") Mothes comprueba una acumulación activa con el aumento de peso durante el mes de Junio. Al pasar el peso fresco de 102 a 885 gr. el nitrógeno nicotínico ascendía de 3 a 40 mg., lo que equivale pasar del 1,1 al 6,6 % del N total respectivamente.

Después, durante la floración y formación de semillas, descienden los alcaloides.

Si se impide aquella por decapitación de la planta la acumulación se hace mayor de lo normal. Si a consecuencia de la decapitación se desarrollan ramas de las yemas axilares, hay una nueva acumulación, hasta que aquellas florecen, en que descienden de nuevo. Si se suprimen las yemas laterales no hay acumulación secundaria tras la supresión de la yema apical. Las plantas sin yemas al final de la estación, pierden la mitad de su nicotina (Deleane y Vladescu, Smirnov; citados de James (1)).

Chaze, en estudios citoquímicos sobre plántulas de tabaco,

Cuando la plantita tiene 3 - 5 mm. observa bastante cantidad en el meristemo radicular, cofia, copa pilífera y yema epicotiledonar, menos en el hipocótilo y muy poca en los cotilodones. Mas tarde los contiene toda la planta. (De James, 1)

Frey-Wissling (25) utilizando la reacción de la nicotina con el bromuro de osanógeno -que es un fluore-cromo- investigó mediante el microscopio la localización de la nicotina durante la germinación. Observó que primero se formaba en la radícula y el hipocótilo, no existiendo en los cotilodones. Mas tarde, cuando se alargaba el hipocótilo, se empobrecía en alcaloide, mientras que la raíz seguía exhibiendo notable fluorescencia. En plántulas más viejas, la formación de nicotina quedaba restringida a la corteza de la raíz.

Muy interesante también es el trabajo de Codounis (12) que emplea la precipitación con el ácido pícrico para la determinación topográfica de la nicotina en los tejidos de la plántula. Estudia desde el comienzo de la germinación. No halla nicotina durante la salida de la radícula; comienza a verla cuando la raicilla empieza a emitir protuberancias pilosas, apareciendo encima de los puntos de emergencia de estas y debajo de los cotilodones, a los 4 - 7 días de comenzada la germinación. Cuando crecen los pelos (7^º - 11^º días) aumenta rápidamente la nicotina hasta que los cotilodones comienzan a desarrollarse. Entonces disminuye mucho, hasta que la plántula queda casi sin nada, y comienza de nuevo a acumularse lentamente después de la aparición de la segunda hojuela, concentrándose en los órganos externos, principalmente en las hojas. Para Codounis, la raíz principal queda libre de nicotina en todos los estados.

Con la disminución del alcaloide que observa Codounis, coinciden los datos de Schmid y Terrano (61) que dicen hay pérdida de nicotina en la plántula de los 9 a los 16 días. La interpretación que dan al hecho es, que el embrión forma primero nicotina a ex-

de sustancias nitrogenadas que recibe del exterior. El paso de la vida heterótrofa a autotrófa —cambio de metabolismo— coincidiría con el descenso del alcaloide.

También Frey-Wissling (25) estima que, al principio de la germinación se forma el alcaloide en relación con la movilización de las proteínas de reserva en la radícula y el hipocótilo, mientras que después, cuando ha desaparecido la aleurona, se forma en la corteza de la raíz, en relación con la asimilación de albuminoides.

Chase, en los trabajos que ya hemos citado, había observado cómo, en radículas muy jóvenes, las células meristemáticas presentan granos de aleurona que se ^{deshacían} deshean en la germinación, transformándose en vacuolas fluidas que absorbían activamente el rojo neutro. El yodo-yoduro potásico descubría alcaloides en cuanto se licuaban los granos. Un poco después surgían las vacuolas normales que deban, desde muy pronto, reacción alcaloídica, y continuaban dándose hasta que se unían en una vacuola central.

En la planta adulta entre los 30-45 días se observa una localización diferencial del alcaloide. Falton (citado de Lee Marion en "The Alkaloids") da la siguiente distribución para los distintos órganos:

Flores	————	5 %
Tallo.	————	18 "
Raíces.	————	13 "
Hojas.	————	64 "

Mothes (53) encuentra dentro de la planta el siguiente gradiente:

Hoja baja	>	hoja joven
Hojas	>	tallo.
Corteza del tallo	>	xilema y médula.

es la raíz.

Hasta llegar a esta conclusión definitiva se realizaron muchas experiencias de diversos tipos.

Mothes (53) observó que las hojas de tabaco acumulaban nicotina mientras estaban unidas a la planta, incluso en las peores condiciones ambientales y nutritivas, pero dejaban de acumularla en cuanto se las separaba del tallo. Vickery y Pucher (citados de Ciferri (10)) abonan la necesidad de la unión a la planta para que la hoja acumule el alcaloide.

Experimentalmente dejó Dawson establecidos los siguientes hechos:

a) El brote de tabaco separado de la raíz y cultivado en agua deja de acumular nicotina (15)

b) Los segmentos de tallos colocados en cámara húmeda emiten ramas laterales que no contienen nicotina (16)

c) Las callosidades formadas en los extremos de esos segmentos tampoco contienen alcaloides (16)

d) El callo formado en la sección del peciolo de la hoja aislada contiene nicotina. Pero analizada toda la hoja se ve que es que allí emigró desde el limbo, no que haya aumentado su proporción total (16).

e) La hoja enraizada en arena acumula nicotina (16)

De todas estas experiencias se deduce, no sólo que la hoja necesita estar unida a la planta para que acumule alcaloide, sino que son precisas las raíces para que esto ocurra.

Las experiencias de injerto también indicaban la importancia de las raíces para la formación de la nicotina.

Las primeras fueron realizadas entre 1936 - 38 por Bernardini en Italia y Nath en la India con injertos entre tabaco y tomate. Mientras en las hojas de tomate injertado sobre tabaco se acumulaba el alcaloide, disminuía en las de tabaco en el injerto recíproco.

Dawson (16) que tuvo la precaución de defoliar patrón e injerto para que el alcaloide contenido inicialmente en las hojas de tabaco no perturbara los resultados obtenidos. Realizó injertos recíprocos y de aproximación entre tabaco y tomate, observando gran cantidad de alcaloide en las hojas formadas por el tomate injertado sobre el tabaco, mientras que en los injertos de este sobre aquel sólo encuentra trazas en las hojas más bajas. En los injertos de aproximación observó acumulación sectorial del alcaloide en el tomate. (Posteriormente ha realizado Dawson nuevas experiencias de injerto entre especies de *Nicotiana* formadoras de otros alcaloides obteniendo resultados muy interesantes acerca de la síntesis de anabasina y nornicotina (18)).

Con todo lo expuesto se llegó a la conclusión de la síntesis radical de la nicotina, pero la comprobación definitiva la consiguió también Dawson (17) con el cultivo "in vitro" de las raíces de tabaco.

Para James (1) el hecho de que se haya comprobado que las raíces aisladas producen nicotina así como todas las demás observaciones derivadas de experiencias de hojas aisladas e injertos, no excluyen al que la puedan formar otros órganos si reciben el precursor adecuado. Así interpreta que ocurría en la experiencia de Dawson sobre probables precursores de la nicotina (15) cuando este autor halló que aumentaba el contenido en brotes sumergidos en solución de prolina.

Se pregunta James en que momento debemos considerar que comienza la síntesis de alcaloides y retrocede hasta el punto en que ingresan en la planta los elementos químicos que los integran. Como en ellos figuran C y N considera que estos cuerpos habían de llegar a las raíces desde los tejidos absorbentes y órganos asimiladores, (el C probablemente en forma de carbohidratos) e ingresarían en los alcaloides vía sustancias nitrogenadas sencillas. La raíz no haría mas que reunir en un último enlace los componentes

una casa y quienes son sus artífices nos retrotrajéramos hasta la mina de donde se extrajo el hiorro que dió origen a las vigas o al bosque cuyos árboles formaron la madera que interviene en su fabricación).

Ya vimos también las explicaciones que sugería este autor para el hecho de que un órgano o tejido que normalmente contiene alcaloides no los contenga en condiciones experimentales, como ocurre con los injertos. Según él, cabría preguntarse si el no presentarlos en esas circunstancias, significa realmente que no los pueden formar por sí mismos o si se deberá bien a que les falte el precursor necesario que les hubieran proporcionado sus raíces, o a que su fisiología se haya modificado por influencia del patrón.

Circulación de la nicotina

Desechada la idea de la síntesis en las hojas y aceptada la de las raíces como órgano formador (dejando aparte las especulaciones de James) era necesario que hubiera una circulación del alcaloide hacia las partes aéreas.

Cicerone y Marocchi (citados de Ciferri (10)) habían observado que la acumulación de nicotina en el brote coincidía con el gradiente transpiratorio.

También el gradiente en la distribución del alcaloide en el brote, observado por Mothes (53), parecía indicar una relación con la transpiración.

Dawson en 1941 (citado de Ciferri (10) y de James (1)) observó que fluye nicotina con la savia que mana de tocones de plantas cortadas. Mas tarde, 1942, comprueba mediante injertos de aproximación que hay un transporte del alcaloide de abajo arriba por vía xilemática (16) transporte que confirman Mothes y Hieke (54) y Pal y Nath (58).

Frey-Wissling (25) demostró también ese transporte microscópicamente para plántulas de tabaco, utilizando la fluorescencia del

no pensó en algún momento (como para todos los alcaloides en general) si podría haber también un transporte por vía floemática. A este problema hemos aludido al hablar de circulación en el capítulo anterior y hemos visto que las observaciones y experiencias sobre este punto no son concluyentes. El estado químico que presenta la nicotina durante el transporte se desconoce.

Jackson (citado de Ciferri (10)) la encuentra en las hojas formando sales con los ácidos málico y cítrico (existe un estrecho paralelismo entre el contenido de la planta en nicotina y en ácido cítrico) y se supone que tal vez transformada en sales entre en el conjunto del sistema tampón de la planta en concentraciones reducidas.

También parece ser que se encuentra formando glucósidos: tabacilina (Berbieri, 1928) y tabacina (Yamafuji, 1932) (R.f. de Leo Marion (1))

Biosíntesis

Como la de los demás alcaloides se desconoce como pueda tener lugar la de la nicotina.

Hay tendencia a buscar los precursores entre los productos de desintegración de los albuminoides ya que ~~se~~ como dijimos, ^{se} ha observado en bastantes casos que aumentan los alcaloides cuando hay destrucción de prótidos. Algunos aminoácidos parecen especialmente indicados para servir de base para su síntesis.

Para el caso concreto del tabaco se ha ensayado experimentalmente el efecto de varias sustancias que se consideraron posibles precursores de sus alcaloides: prolina, ácido glutámico, ornitina, ácido nicotínico y derivados (éster metílico, nicotinamida), ácido pirrolidonecarboxílico, arginina, glicina, tartrato de pirridina, ácido α -amino- α -valerianico, etc.

De todas estas sustancias las que ha producido acción más evidente ha sido la prolina. La del ácido nicotínico es muy discu-

han basado en un principio en la hipótesis de Trier (74) quien sugiere que la formación del alcaloide principal del tabaco tendría lugar a partir de la prolina y el aldehído fórmico.

Dos moléculas de metanal por la reacción de Cannizzaro darían una de alcohol metílico y otra de ácido fórmico. Una molécula de prolina reaccionaría con el metanol dando metil-prolina; otra molécula de prolina se uniría al ácido fórmico y daría ácido nicotínico. El ácido nicotínico y la metil-prolina se unirían, por decarboxilación oxidativa, dando nicotina.

El mayor inconveniente de esta hipótesis es la dificultad de producir el anillo de la piridina del ácido nicotínico a expensas de la pirrolidina de la prolina. No existe ninguna evidencia que apoye ese tránsito.

Robinson (citado de James (1)) supone el que la pirrolidina pudiera surgir de la ornitina y el anillo piridínico del ácido acetondicarboxílico, formaldehído y amonio. La ornitina no parece existir como tal en las proteínas vegetales, pero siempre se halla en ellas Arginina que puede dar aquella por simple hidrólisis.

A pesar de sus inconvenientes, en la hipótesis de Trier se han basado las primeras experiencias sobre biosíntesis de nicotina y ha sido la prolina el aminoácido más ensayado.

El método más corriente de realizar estos ensayos es el presentar a un tejido el supuesto precursor y analizar a intervalos para ver el aumento de alcaloides.

Los distintos autores tratan de abordar el problema con diversas técnicas. James hace la crítica de estas experiencias en las que ve muchas dificultades e inconvenientes. Para él no se conoce el tejido ideal sin alcaloides capaz de formarlos bajo manipulaciones (ni siquiera considera que lo sean los injertos sobre plantas no productores). Ve otro inconveniente en el hecho de que no existan plantas absolutamente idénticas en suficiente número sobre las que realizar las experiencias. Estima difícil

asiento de la síntesis. Sobre todo el principal inconveniente para él es la dificultad de realizar un "muestreo" correcto. Para poder estimar resultados será preciso tomar hojas de todas las edades y en todas las posiciones en el tallo ya que el contenido de nicotina varía mucho de unas a otras según comprobó Mothes (53).

(Acaso nuestra técnica del cultivo de raíces pueda esquivar, como dijimos, algunas de estas dificultades).

Vamos a señalar algunas de las experiencias más importantes que se han realizado en este campo:

Klein y Linser probaron por inmersión de hojas aisladas en una solución de las sustancias a ensayar y por inyección en tallos, la acción de prolina, ácido glutámico y ornitina (Ref. de James (1) y de Ciferri (10)).

Hallaron un aumento de nicotina en tanto por ciento de materia seca con la prolina. No está claro que la hubiera con las otras sustancias.

Gorter, con tallos foliados introducidos en una solución nutritiva, ensayó el efecto producido por la adición de prolina (Ref. también de James (1) y de Ciferri (10)).

Sus resultados no confirmaron los de la experiencia anterior, pues si bien obtuvo un ligero aumento de nicotina en el tallo tratado con prolina sobre el testigo sin ella, la cantidad de alcaloides en ambos resultó inferior a la que contenían antes del ensayo (determinada en otras plantas de sus mismas condiciones). Gorter estimó la nicotina por unidad de superficie foliar. Pero según James y Ciferri son dudosos los datos de esta experiencia porque no tuvo en cuenta el diferente contenido de las distintas hojas.

Dawson (15) con la misma técnica, pero seleccionando los tallos, de plantas que había cultivado él mismo, de manera que fuesen lo más iguales posible, y estimando después la nicotina de la totalidad de las hojas, probó la acción de: prolina, ácido pirrolidincarboxílico, ácido glutámico, arginina, ácido α amine-

un aumento evidente del alcaloide. Aumentaba el contenido total por planta sobre el control y sobre la cantidad inicial e incluso sobre el de plantas enraizadas de la misma edad. También aumentó el porcentaje.

Para James hubo realmente formación de nicotina a expensas de estas sustancias aún cuando el propio Dawson tratara posteriormente de interpretar de otra forma sus resultados. (Después de su éxito con el cultivo de raíces).

Con el ácido nicotínico se complicaban los resultados por actuar, al parecer, como sustancia de crecimiento. Observó aumento de nicotina por planta, pero no del porcentaje en peso seco. En posteriores experiencias se comprobó que los tallos foliados cortados, introducidos en solución nutritiva, en presencia de ácido nicotínico y expuestos a la luz, ganaban peso en vez de perderlo. El aumento total de nicotina era consecuencia del aumento de masa sobre el control con agua. En cuanto a los demás compuestos que ensayó no produjeron efecto positivo alguno.

Ciferri y Pratesi (citados por Ciferri(10)) con técnica análoga a la de Dawson, probaron el efecto del ácido nicotínico, nicotinamida y ester metílico del ácido nicotínico, añadidos a una solución nutritiva sin sales nitrogenadas y con sacarosa. Encontraron que el porcentaje de alcaloides disminuía en los tallos de la experiencia con relación a los del testigo que dispuso de sales nitrogenadas. Los alcaloides secundarios no habían variado y el N total tampoco sufrió variación.

Deducen los autores que, ante la falta de nitratos y exceso de hidratos de carbono, la planta reaccionó tomando N de la nicotina para formar proteínas que equilibraran la masa de glúcidos.

En experiencia semejante pero sin sacarosa y con nitratos, los mismos autores mas (Carabieri (1944-46)) hallaron que el nitrógeno total de la planta aumentaba con el ácido nicotínico y derivados en un 40 % y la nicotina en un 396-479 %, siendo mas eficaz la anida

conclusion que el ácido nicotínico puede ser una base para la formación de nicotina en las condiciones de su experiencia.

En otro trabajo Ciferri (1944) cultivó, en solución de Knop, plantas completas y hojas aisladas de tabaco, añadiendo a la solución tartrato de piridina. Obtuvo un aumento de alcaloides con respecto a los testigos sin tartrato. El aumento fué mayor en la planta que en la hoja aislada. Además, en la planta completa aumentaba el contenido en alcaloides con la concentración de piridina; en las hojas resultó una proporcionalidad inversa. Esto le confirmó en la idea de que, si bien las hojas pueden sintetizar nicotina si reciben el precursor necesario, (como admite también James en contra de la opinión de Dawson) la sede normal de la síntesis es la raíz.

La consecuencia que puede deducirse de todas las experiencias anteriores es que el precursor más probable de la nicotina parece ser la prolina. Los resultados respecto al ácido nicotínico (y sus derivados) son mas dudosos y los demás aminoácidos supuestos posibles precursores, han dado resultados negativos.

III.- INFLUENCIA DE LOS FACTORES CULTURALES Y NUTRITIVOS

SOBRE EL CRECIMIENTO Y FORMACION DE ALCALOIDES EN PLANTAS

DE TABACO PRINCIPALMENTE

Según hemos dicho en la introducción, dedicamos al tema señalado en el título un apartado especial -no obstante su relación con las cuestiones que acabamos de ver- por el interés especial que tiene para las experiencias que hemos realizado.

La planta de tabaco en cultivo en el campo es muy exigente en cuanto a aporte de elementos minerales que debe ser abundante. Su sensibilidad para la carencia o deficiencias de los nutrientes, junto con su rápido crecimiento y gran desarrollo foliar, han hecho que sea adoptada como planta tipo para el estudio de la nutrición de las plantas en general por el Departamento de Agricultura de E.E. U.U. También es extremadamente sensible a la presencia en el suelo de ciertas sustancias orgánicas tóxicas para los vegetales, por lo que también es considerada por aquel Departamento como planta espía para dichas sustancias (Ciferri y Scaramuzzi (11)).

Requiere también el tabaco una buena humedad del suelo, pero al mismo tiempo exige que éste sea ligero, lo que dificulta lo primero.

Muy estudiado por su importancia económica, se conoce bastante bien su reacción a varios factores ambientales y culturales en cuanto a su aspecto utilitario se refiere (cantidad y calidad de las cosechas), no tanto en lo que respecta a la influencia de esos factores sobre la formación de sus alcaloides (Ciferri (10)).

Se admite generalmente que las condiciones nutritivas ~~afectan~~ afectan tanto al crecimiento como a la formación de alcaloides en las plantas productoras de éstos. Cualquier factor que active la vegetación, que exalte el metabolismo, hace aumentar el contenido de alcaloides por planta.

Así, el abonado abundante con elementos minerales proporcionados hace aumentar el desarrollo y la formación de alcaloides sin alterar su relación; el abonado con estiércol produjo en Datura stramonium aumento del peso y del contenido alcaloídico (Mitscher y Wasicki (1911), citados de James (1)); los factores biológicos, algunas vitaminas (B₁, C) los oligoelementos (Mn, Cu, Zn, B) parece actúan en el mismo sentido de activar el crecimiento haciendo aumentar el contenido global de alcaloides, al menos en el tabaco (Ciferri (10), James (1)).

La decapitación de las plantas de tabaco antes de la floración conduce también a aumento de alcaloides al activar el desarrollo de las partes vegetativas (Ciferri (10)).

James atribuye el aumento de alcaloides que se observa con los factores indicados, al hecho de que los tejidos juveniles en crecimiento los acumulan (lo cual no quiere decir que los sintetizan, pues igualmente acumulan sales minerales) y por tanto los hará aumentar toda causa que active su formación. Un poco difiere de esta conclusión la observación de Dawson (19) de que la acumulación de nicotina en los órganos aéreos no está en relación con el crecimiento de la planta.

Y bien en cuanto el aumento de desarrollo y consiguiente elevación del contenido global de alcaloides por planta con los factores nutritivos favorables están, en general, de acuerdo con los diversos autores (Manske (1) opina que es solo moderada la influen-

aumento real de su porcentaje en peso seco. Y así Mitlacher y Wasicki, en el trabajo citado anteriormente, no hallan aumento del tanto por ciento en peso de los alcaloides de Datura abonada con estiércol, aunque si lo encontraron para el contenido total.

Acción del nitrógeno

Bien conocida su importancia para la nutrición de las plantas en general, es especialmente importante para el tabaco, ya que interviene en la formación de la nicotina. En relación con este último aspecto es uno de los elementos mejor estudiados.

Se admite en general y así lo expresa James (1) en su revisión de trabajos de varios autores, que los abonos nitrogenados actúan sobre las plantas alcaloide-fermadoras haciendo aumentar el peso en seco de muchas —entre ellas el tabaco— mientras que para otras son indiferentes o incluso perjudiciales.

Ciferri y Scaramuzzi (11) observan también aumento del desarrollo de la lámina foliar en plantas de tabaco con el abonado con nitratos.

Sobre el contenido en nitrógeno también parecen influir los abonos nitrogenados. Según observan también Ciferri y Scaramuzzi el abono nitrogenado se traduce para el tabaco en un aumento del N total de la planta; su deficiencia en el medio por un descenso del mismo. En la planta completa en condiciones normales hay un 3,2 % que puede descender hasta 2,2 en caso de relativa carencia. También Mc Evoy (48) comprueba cómo se refleja en la composición elemental de la planta la reducción del N en la dieta, la cual produce no solo disminución de este elemento sino también de otros (K, Ca, Mg y S).

El síntoma de la carencia en planta completa es el color amarillo-verde pálido de las hojas, especialmente las inferiores. Se retarda además el crecimiento, la floración y se reducen las dimensiones de hojas y tallo. El contenido de las hojas en N desciende, mientras que el del tallo permanece aproximadamente igual o apenas menor (Ciferri y Scaramuzzi (11)).

Así lo ha observado Anneta (citado de James, (1)) en experiencias de campo con Papaver somniferum, al obtener un gran rendimiento en opia consecuencia de un aumento del crecimiento, y así lo indican Ciferri y Scaramuzzi (11) que dicen que una acumulación de nicotina acompaña al aumento del desarrollo foliar en hojas de tabaco abonado con nitratos. Lashuk (43) ve como la ausencia de nitrógeno en la dieta del tabaco hace disminuir los alcaloides, mientras que en cambio Mothes (53) en otro orden de experiencias, comprobó que la hoja de tabaco acumulaba nicotina aún con falta de N.

Acción del fósforo

Ciferri y Scaramuzzi (11) nos dan los siguientes datos: Siendo uno de los elementos más fundamentales para la nutrición mineral de la planta su proporción media en la de tabaco no es elevada, aproximadamente un 0,5%. El contenido en la planta fósforo-carente varía poco. Si hay gran exceso se acumula en las hojas donde puede llegar a estar en la proporción de 1,1 %. Su carencia en la planta completa produce fuerte disminución del desarrollo dando un marcado nanismo.

Tiene gran interés su interferencia con la mayor parte de los metales fundamentales para la vida de la planta por la tendencia a formar fosfatos insolubles. Este fenómeno es particularmente importante con la disminución de acidez del medio.

No se conoce aún mucho de esta interferencia en el tabaco.

James (1) nos dice que el abonado con fósforo hace aumentar generalmente el peso seco de las plantas. Influye también sobre el contenido alcaloídico. Esta influencia puede ser en uno u otro sentido según la planta:

En Atropa belladonna sobre suelo arenoso hacía aumentar hojas, raíces gruesas y finas y porcentaje y miligramos totales de alcaloides en esos órganos. En toda la planta aumentaba la relación

contaje (Salgues)

En Papaver somniferum aumentó el cjo y el porcentaje en él de mofina, con la adición de P en forma de superfosfatos en experiencias de campo (Annett y Singh (1927)

(Ref. de James (1)).

Para el tabaco vió Lashuk (9) que la ausencia de fósforo hace aumentar los alcaloides.

Mc Evoy (48) observó que la reducción del P₂ en la dieta del tabaco reduce su contenido en la misma, así como el de N y Mg.

Influencia del azufre

La cantidad requerida por la planta de tabaco es pequeña ya que lo contiene en cantidad discretas: 0,3 %. Si la planta padece deficiencia de este elemento desciende a 0,2 su contenido. Cuando lo absorbe o exceso se deposita inalterado en sus tejidos.

En la planta con deficiencia de azufre se produce ligera clorosis; si la carencia es aguda se retarda el crecimiento.

Cloro

No se considera elemento indispensable para el crecimiento de las plantas en general. Sin embargo tiene un decidido efecto sobre el tabaco.

El contenido medio de la planta entera es de 0,9% si el Cl se encuentra en proporción normal en el terreno. Si hay deficiencia puede bajar al 0,1 % y ascender hasta el 5 % si hay exceso. El cloro produce hojas grandes, turgentes y de color claro. En general, presta a la planta resistencia a la sequedad. Cuando se halla en exceso dentro de la planta produce alteraciones especialmente en el metabolismo de los carbohidratos.

Existe una cierta relación entre el contenido en Cl y en Mg de la planta. Un aumento del 1º acarrea un aumento del segundo (Ciferri y Scaramuzzi (11)).

el tabaco es relativamente elevada y por lo general es el componente más importante de las cenizas.

La proporción varía mucho por planta normal y con la cantidad del elemento que tiene a su disposición:

En planta normal ——— 3,6 %

" " con deficiencia - 1,3 "

" " " exceso. ——— 5,7 "

Los efectos de la carencia son clorosis y alteración morfológica de las hojas.

Parece influye decisivamente en la fotosíntesis y traslocación de los carbohidratos.

Para de Evoy (48) la reducción del K en la dieta no influye sobre el contenido de N, solamente disminuye la proporción de él mismo.

James (1) nos dice que el abonado con sales potásicas hace aumentar el crecimiento de las plantas productoras de alcaloides aunque menos que el N. Parece ser que para el efecto que produzcan es importante el tipo de suelo, siendo más visible ese efecto en suelos silíceos^{cb} ligeros.

También nos habla de que favorece la síntesis de proteínas.

El abonado potásico parece origina un ligero descenso de alcaloides en diversas plantas (Atropa, Datura, Hyoscyamus, Lupinus). En general son muy pequeños los cambios de la proporción de alcaloides debidos a este elemento. A veces produce disminución del porcentaje pero no de la cantidad total por planta; es que ha originado aumento del crecimiento.

Cuando hay descenso del porcentaje de alcaloides lo hay también de la relación $\frac{N \text{ alcaloídico}}{N \text{ total}}$ aunque puede haber aumento del N/ total.

Como vemos la influencia de este ion es muy compleja.

acción de este elemento.

Se considera en general que un encañado fuerte produce cosechas satisfactorias de Atropa, Datura y Hyoscyamus.

El tabaco parece requerirle menos activamente que al potasio. El contenido en planta entera normal es de un 3,5% y baja a 0,5 % en condiciones deficitarias.

Su deficiencia produce modificaciones foliares; su exceso tiende a prolongar el periodo de desarrollo vegetativo.

Parece que su papel es equilibrar la absorción de otros elementos (Mg, Mn.) que podrían llegar a ser tóxicos por acumulación.

Se ha observado su acción sobre el contenido alcalóidico en Atropa. Sobre suelo arenoso, la adición de Ca produjo, además de aumento del desarrollo de todas las partes de la planta, un pequeño aumento de alcaloides totales y de su porcentaje. En cultivos sobre arena con sales puras no aumentó el crecimiento; si la proporción de alcaloides y la relación $\frac{N \text{ alcalóidico}}{N \text{ total}}$.

Se sabe, por otra parte, que retarda la síntesis de proteínas en plantas (Steward, Sout y Proton, ref. de James (1)) y parece se establece una pugna por el N entre K y Ca durante el crecimiento de la planta, tendiendo el K a llevarle hacia proteínas, el Ca hacia alcaloides.

Influencia del Mg.

La misión fundamental de este elemento es integrar la molécula de clorofila de la que forma aproximadamente un 2 % en peso.

La planta de tabaco es muy sensible a su deficiencia y el contenido oscila mucho de una planta que recibió suministro normal a otra crecida con carencia de este metal. De 0,8 % desciende a 0,4.

La carencia de Mg da lugar a una clorosis difusa.

Parece que hay interferencias entre Mg y K y Ca, entre Mg y P y entre Mg y cualquier oligoelemento.

La deficiencia en K y Ca hace aumentar el Mg (James, 1; y

Importancia del hierro

En las hojas del tabaco hay 0,1 % o menos de este elemento. (Se cuenta entre los oligoelementos).

En el tabaco en cultivo normal raramente se observa carencia de este metal, que se traduce en clorosis generalizada.

Equivalencia entre nitratos y sales amónicas

La equivalencia o no equivalencia del N nítrico y amónico para la nutrición de las plantas, en general, y para la formación de alenloidos, en particular, es problema interesante.

Se admite corrientemente que todas las plantas pueden poseer la capacidad de utilizar una u otra forma de nitrógeno mineral y así afirman que ocurre para el tabaco, en condiciones normales de cultivo, Ciferri y Scarumuzzi (11).

Sin embargo, hay plantas que utilizan mejor una de estas formas y otras la otra.

El - Shishiny (24) hace un detallado estudio de la absorción y asimilación de los iones NO_3^- y NH_4^+ sobre tejidos de reserva de zanahoria, rábano y batata, cultivando prismas de estos tejidos durante un corto tiempo en soluciones aireadas de Cl H_4 , $\text{NO}_3 \text{ K}$ y $\text{NO}_3 \text{ NH}_4$.

Y al bien ve que los dos iones son absorbidos por igual por los tejidos de las tres plantas halla que con su utilización no ocurre lo mismo, pues mientras los de batata y zanahoria asimilan muy rápidamente los iones NH_4^+ , en los de rábano es muy lenta su asimilación, acumulándose el amonio en las células. Las dos primeras plantas parece están adaptadas a la utilización de más nitrógeno amónico que nítrico; lo contrario ocurre para el rábano.

Observa también que el metabolismo del N varía en las distintas plantas de manera distinta según cual sea la fuente del mismo. Los productos finales son los mismos con ambos iones (no observa, como otros autores afirman, que de los nitratos se formen más compue

Delwiche (21) en experiencias con N isótopo sobre hojas de tabaco aisladas, ve como estas incorporan rápidamente los iones NO_3^- en forma de amidas, aminas y amonio y que, en cambio, no nitrifican el ión NH_4^+ .

Respecto a la influencia de uno y otro ión sobre la formación de alcaloides, James (1) admite que las sales amónicas producen un aumento real en la proporción de alcaloides aún cuando a veces reducen el desarrollo de la planta. A estas conclusiones llega dediciéndolas de datos aportados por:

Cronwell, quien en experiencias de inyección de nitratos y sales amónicas, o riego con soluciones de estas sales en plantas de belladona, comprueba que con nitratos hay un aumento de masa y de alcaloides por planta; con las sales amónicas aumento de alcaloides por ciento.

Downson en cultivos en arena de tabaco turco comprueba lo mismo (14) y Hothes (53), que en cultivos en tiesto e hidropónicos de plantas de tabaco con cantidades variables de sulfato amónico, halla cuando hay un exceso de amonio, aumento de alcaloides totales y por ciento de las relaciones: $\frac{\text{nitrógeno nicotínico}}{\text{nitrógeno total}}$ y $\frac{\text{nitrógeno nicotínico}}{\text{nitrog. proveído}}$.

Esto último lo interpreta James admitiendo que el amonio entra directamente en la formación de la nicotina, mientras que los nitratos, reducidos muy lentamente por la planta, nunca determinan un exceso de NH_4^+ en la misma y por tanto influirían solo indirectamente en la formación de alcaloides a través de un mayor crecimiento.

También Mc Neir (Citado de James, (1)) opina, que el N amoniacal es más fácilmente transformado en alcaloides que el nítrico, tal como que Jerrano (62) observa, que los nitratos son más eficaces que las sales de amonio para la formación de nicotina en plántulas de tabaco considerando la cantidad de alcaloide por embrión. También comprueba que hacen aumentar más el crecimiento de las

vor con nitratos.

En experiencias de corta duración realizadas con hojas de belladona aisladas sumergidas en una solución de sulfato amónico y azúcares y mantenidas en la oscuridad, se ha hallado un aumento, tanto de la cantidad total de alcaloides por hoja como de su porcentaje en peso, en relación con hojas arrancadas al mismo tiempo y mantenidas también en la oscuridad, sin tratamiento o sumergidas solo en azúcares (Oxfor Méd. Pl. Sch. (1945); ref. de James (1)).

Experiencias semejantes realizadas por Mothes con hojas de tabaco habían dado resultados poco evidentes.

Finalmente para Salgues (de James (1)) la respuesta a los abonos nitrogenados depende mucho de la naturaleza del suelo. Un aumento claro en el porcentaje de alcaloides con el empleo de aquellos solo se obtiene, para Atropa belladonna, en suelos arcillosos duros, en los que repetidos ensayos han dado como resultado un aumento por planta y en porcentaje, tanto con sulfato amónico como con nitrato sódico, siendo este último mas eficaz, especialmente para la raíz, cuyo desarrollo aumenta mucho. En cambio, en las mismas plantas de belladona, pero sobre suelo calizo, hubo aumento del peso en seco de hojas y tallos con los sales amónicas, pero no de las raíces que sí aumentaban con el nitrato sódico.

Según Mc Nair (ref. James (1)) las plantas productoras de alcaloides se encuentran en suelos con pH comprendidos entre 4 y 8 pero su porcentaje decrece cuando la acidez se acentúa. Lo interpreta como señal de que la síntesis de alcaloides es más fácil bajo condiciones de mayor alcalinidad, lo cual le atribuye, a su vez, a que en medio alcalino toma mejor la planta el N amónico, que él considera es más fácilmente transformado en alcaloides que el nítrico.

Ozoron había observado que los fertilizantes alcalinos aumentaban el crecimiento y la cantidad de alcaloides, tanto totales como porcentaje, en plantas de Cinchona para la que encontró como más favorables los pH comprendidos entre 7, 3 y 8. Los abonos generadores de acidez —como las sales de amonio no corregidas con caliza— reducían la producción de alcaloides.

Se ha indicado más arriba que el encalado producía efectos benéficos sobre Atropa. Esos resultados no deben achacarse a su acción sobre la acidez del suelo por cuanto Stillings y Laurie hallaron mejor crecimiento y porcentaje de alcaloides para esta planta en una serie de cultivos con pH de 5,5 a 6,5 que en otra en los que estaban comprendidos entre 6,5 y 7,5 (Referencias de James (1)).

En cuanto al tabaco, parece tolera un suelo ácido (pH de 4,5-5,5) prospera muy bien en suelos minimácidos (pH: 5,5-6,5) y neutros (pH : 6,5-7,5) mientras que en los alcalinos es fácilmente afectado por la podredumbre de las raíces (Ciferri y Scaramuzzi (11)).

Hildebrandt, Riker y Duggar (39) cultivando tejidos de tabaco "in vitro", encuentran como pH óptimo el comprendido entre 5 - 5,4.

Con relación a la formación de alcaloides, como dato especí-

on lantaa culti vadas en arena.

P A R T E E X P E R I M E N T A L
=====

IV.- EXPERIENCIAS QUE COMPRENDE NUESTRO TRABAJO

=====

A dos tipos de problemas se han dirigido nuestras investigaciones:

Por un lado, a ver la influencia que sobre el desarrollo en general, formación de nicotina y contenido en nitrógeno de las raíces, produciría la variación de los elementos nutritivos u otros factores del medio, como el pH. En relación con este aspecto preparamos las experiencias:

1ª) Condiciones nutritivas generales.

2ª) Acción específica de las sales fundamentales de la solución nutritiva.

Esta experiencia la escindimos en tres:

a) Acción producida por la reducción de los distintos aniones.

b) Acción producida por la reducción de los distintos cationes.

c) Ampliación de la acción de los nitratos. Efecto producido por una reducción al mínimo o por su presencia en exceso.

3ª) Efecto producido por variaciones en la concentración del azúcar contenido en el medio.

4ª) Acción producida por variaciones del pH.

5ª) Equivalencia entre nitrógeno nítrico y amoniacal.

Por otro lado, hemos querido verificar, para las raíces, los conocimientos que se tienen sobre acción de las sustancias consideradas como más posibles precursores de la nicotina. En este sentido hemos realizado dos ensayos:

nico.

Además, hemos cultivado raíces de Nicotiana glauca Graham y Nicotiana sylvestris Speg. et Com. para comprobar si, como las de N. tabacum L., producen alcaloides cuando se encuentran aisladas del resto de la planta (Experiencia 7ª).

V.- TECNICA GENERAL DEL CULTIVO DE RAICES "IN VITRO"

~~XX~~

El cultivo de cualquier órgano o tejido vegetal tiene, a grandes rasgos, las mismas exigencias. Solo pequeños detalles en cuanto a escisión del órgano o a requerimientos nutritivos diferencian el de raíces de los demás.

Para trabajar sobre ellos hemos seguido las normas de los dos libros más clásicos sobre técnica de cultivos de tejidos vegetales: el de Gautheret (31) y el de White (71).

La primera condición que se requiere es una asepsia perfecta. El tejido u órgano y todo lo que con él se ponga en contacto han de estar absolutamente estériles.

Por tanto, de lo primero que será preciso disponer es de uno o varios autoclaves con los que esterilizar el material y los medios de cultivo que hayan de emplearse.

Será preciso disponer de bujías y embudos o crisoles con filtros bacteriológicos para los casos en que no sea posible emplear el calor.

Una cámara pequeña y sin corrientes de aire con mesa apropiada donde realizar las siembras es también imprescindible.

Es también necesario mantener los cultivos a una temperatura determinada. Se necesitará una estufa cuyas dimensiones variarán según la finalidad que se persiga con los cultivos.

(En nuestro caso el volumen de las experiencias requería que la estufa fuera una habitación de regulares dimensiones)

Medios nutritivos

Es preciso colocar a las raíces en un medio de cultivo que le proporcione cuatro clases de sustancias: agua, sales minerales

Agua

Debe ser bidestilada en aparato de vidrio Pyrex para que no lleve rastros de Sn o de Cu.

(Así fué la que empleamos en todo momento y fueron algunos millos de litros los que utilizamos a lo largo de las diversas experiencias).

Sales minerales

Deben aportar los elementos fundamentales que todo vegetal superior toma del suelo. La base de todos los medios nutritivos utilizados para el cultivo de tejidos son las soluciones nutritivas clásicas para cultivos de plantas, especialmente la de Knop.

Las sales deben ser muy puras.

Azúcares

Es preciso suministrar a las raíces un carbohidrato ya que no pueden recibirlo de la parte aérea de la planta.

Se utilizan azúcares diversos (incluso se han ensayado otros compuestos carbonados) pero los más empleados son: sacarosa y glucosa.

No es indiferente el hidrato de carbono que haya de utilizarse. Parece que unos son más convenientes que otros en general (la lactosa es totalmente inadecuada siempre) y las distintas plantas parecen tener preferencias específicas sobre estos compuestos (4)

El azúcar suele ir en la proporción de 20-30 gr. por litro.

Sustancias de crecimiento

El medio ha de llevar una o varias de estas. Los primeros cultivos de raíces se consiguieron con la adición de mezclas complejas de sustancias orgánicas: extracto de levadura (Robbins, White); extracto de carne de Liebig (Kotte); peptonas (Robbins) o hidrolizado de fibrina (White). Hoy se utilizan diversos compues-

es la B₁ (a veces ha sido substituida por tiazol y pirimidina)

La acción de la piridoxina, vit. B₆, es más discutida o al menos parece no es tan universal su necesidad. De todas formas es componente normal de muchos medios.

También pueden llevar ácido nicotínico (parece que es indispensable para las raíces de ciertas plantas como las leguminosas).

El ácido panoténico, la biotina, el inositol, la vitamina C, son empleadas también por algunos autores (Morol, 49, 51).

El ácido β -indol-acético y compuestos afines, necesarios para el cultivo de tejidos no parece lo sean para el de raíces aunque se dice favorecen el crecimiento de las de maíz.

También se utilizan ciertos aminoácidos principalmente glicocola o mezclas de varios.

La leche de coco con la que logra Morol los primeros cultivos de tejidos de Monocotiledóneas (50, 52) no nos dió resultado cuando la utilizamos para intentar cultivar raíces de Androcymbium graminum.

El medio de cultivo para las raíces ha de ser líquido (al menos es más conveniente).

Recipientes de cultivo e instrumental

Los recipientes adecuados para el cultivo de raíces son matraces de diversos tipos, que deben tener cuello corto y ancho para evitar que rocen aquéllos sus paredes durante las operaciones de siembra, resiembra y renovación de la solución nutritiva.

Nosotros utilizamos Erlommeyer de 125 c.c. de capacidad para siembras iniciales; matraces esféricos de $\frac{1}{2}$ y de 1 litro para resiembras y renovaciones.

Para tapar los matraces empleamos algodón gase y un vaso de precipitados invertido. (Los tapones los esterilizamos en seco antes de la preparación de los medios nutritivos pues como su volumen es muy grande —especialmente los de los matraces de litro—

ápices radiculares en las siembras y robaduras. También las empleamos para la germinación de las semillas.

El instrumental que manejamos es muy sencillo: unas pinzas de puntas acodadas (de dentista) otras pinzas de puntas rectas finas, con una gruesa de platino y unas tijeras bien afiladas.

La esterilización de este instrumental la realizamos mediante un hervidor eléctrico para instrumental quirúrgico.

Una lamparilla de alcohol que se mantiene encendida durante las operaciones de siembra etc., sirve para producir una corriente de aire descendente y para flamear cuellos de matraces, tapones o instrumental en el momento de su uso.

Iniciación de los cultivos

Las semillas para la iniciación de un cultivo pueden obtenerse de semillas germinadas, de esquejes o de bulbos.

Como los ápices que operamos han de ser estériles y las semillas son muy delicadas para soportar esterilización ninguna, es preciso que se formen en condiciones asepticas, para lo cual (salvo raras excepciones como los frutos carnosos de los que con precauciones pueden extraerse las semillas sin gérmenes extraños) será preciso esterilizar previamente la superficie del órgano sobre el cual se han de formar.

Se han utilizado para este fin diversos desinfectantes: luz ultravioleta, agua de bromo, solución de hipoclorito cálcico, cloruro mercurico, agua oxigenada, etc.

Como otros utilizamos, de preferencia, para esterilizar las semillas, agua oxigenada a 10 volúmenes, que tiene la ventaja de no necesitar el lavado ulterior que requieren otros desinfectantes cuyos residuos ejercerían acción tóxica. Dejábamos actuar el desinfectante durante 75-90 minutos. Con las pequeñas semillas de tabaco tropezábamos con una dificultad: quedaban muchas flotando en la superficie del líquido y no se esterilizaban bien.

que sirviera de contrapeso, atando las puntas de la tela para formar una pequeña muñequilla que introducíamos en el desinfectante. Esto atravesaba la tela y se ponía así en contacto con toda la superficie de la semilla. En el momento de ponerlas a germinar desatábamos la muñequilla dentro del líquido mediante pinzas estériles.

Para la germinación colocábamos las semillas dentro de placas Petri estériles conteniendo agar en agua destilada. Este soporte proporciona la humedad necesaria y resulta luego más fácil separar de él las pequeñas plantitas que del papel de filtro húmedo sobre el que también suelen ponerse y con el que se adhieren a veces fuertemente.

El transporte de las semillas de tabaco estériles a la placa presentaba al principio bastante dificultad. Era casi imposible tratar de coger con las pinzas aquellas pequeñas granitos. La capilaridad resolvió el conflicto: bastaba tocar con las puntas de la pinza entreabiertas el líquido que rodeaba a una semillita para que esta ascendiera por entre las dos ramas siguiendo al agua.

Las placas con las semillas las colocábamos en estufa a 22-23°.

Las semillas de Nicotiana Tabacum L. germinaban muy bien en estas condiciones, pudiendo utilizarse las plántulas a los 12-15 días; las de Nicotiana glauca Grah. germinaban aún más deprisa (utilizables a los 8 días) mientras que las de N. sylvestris Speg. et Com. tardaron mucho, de 4-5 semanas, comenzando a secarse el agar.

Una vez germinadas las semillas se procede al seccionamiento de las raicillas e introducción del ápice radicular en los matraces que contienen el medio nutritivo. El seccionamiento lo realizamos normalmente (para semillas de berenjena, por ejemplo) pasando las pequeñas plántulas a una caja Petri estéril con agua destilada. Con la tijera seccionábamos las raíces flotantes en el agua (Técnica de Luna (46)). Pero la delicadeza de las plántulas de tabaco

Tratamiento ulterior de los cultivos

Una vez que una raíz comienza a crecer, si las condiciones ambientales y nutritivas son las adecuadas, pronto llena el pequeño matraz donde se la introdujo inicialmente.

Es preciso renovar el medio nutritivo y resembrar, retirando las partes con aspecto de menor vitalidad, conservando las más activas.

Esta segunda operación la realizamos periódicamente para la conservación de cepas. Pasamos la trama radicular contenida en un matrás a una caja Petri grande, estéril, en la que hemos vertido previamente agua también esterilizada. Allí seleccionamos las zonas con aspecto de mayor actividad -las raicillas más blancas, con profusión de largos pelos absorbentes y aspecto algodonoso, que emergían en la superficie del líquido- y con las tijeras separamos pequeñas porciones de esta trama que trasladamos a otros matraces con solución nutritiva fresca.

En las experiencias particulares a que se refiere este trabajo no resembramos por interesarnos toda la masa de raíces formada a partir de un ápice. Nos limitábamos a renovar el líquido pasando directamente -mediante el asa de platino- la masa de raíces de un matraz a otro con medio nuevo.

Obtención del material biológico sobre el que habíamos de trabajar.

Dado el que existen factores genéticos no bien determinados que influyen en la formación de alcaloides, tanto en el tabaco como en otras plantas, para que los datos que obtuviéramos en nuestras experiencias no se vieran interferidos por tales factores, consideramos imprescindible el operar sobre raíces que provinieran de una sola semilla.

Comenzamos por poner a germinar, en la forma descrita en la técnica general, semillas de Nicotiana Tabacum L. que nos fueron proporcionadas por

Como las plántulas de tabaco son muy pequeñas y resultaba muy fácil lesionar los delicados meristemos de las raicillas al intentar separarlas del resto de la plántula, procedimos a introducir estas enteras en el medio nutritivo básico que habíamos de utilizar para las raíces, el medio ^{primitivo} nutritivo de White (67). Dejamos a las plantitas crecer así, completas, y cuando las raíces se hubieron desarrollado hasta alcanzar una longitud de 4 - 5 cms. y formado algunas raicillas secundarias, las separamos del brote y trasladamos a otros matraces con solución nutritiva fresca. En este momento cada matraz, que contenía una raíz aislada procedente de una semilla diferente, recibió un número. Dejamos las raíces en estos matraces bastante tiempo, sin efectuar resiembras hasta que la trama radicular formada por sucesiva ramificación de las primitivas llevaba todo el líquido disponible.

En esta primera fase de su cultivo, era muy frecuente la formación de yemas en la sección del extremo proximal de la raíz recién aislada. Al resembrar por primera vez separamos cuidadosamente esas yemas y dividimos la trama radicular de cada matraz en 4 - 5 porciones que pasamos a matraces con líquido nutritivo fresco, los cuales fueron rotulados con el número del matraz de

salir aquella raíz. Solo resembramos las raíces que se habían desarrollado mejor en la siembra inicial.

Hasta aquí habíamos empleado matraces de 125 c.c. con poco medio nutritivo (50 c.c.).

Para la segunda resiembra procedimos de la misma manera, pero seleccionando el grupo de raíces humanas que, en conjunto, mejor se había desarrollado en la primera. Fué el de los cultivos derivados de la raíz nº 74. Y ya abandonamos las demás repitiendo la resiembra de la 74, cada 15 días aproximadamente, utilizando primero matraces de 1 L. con 250 c.c. de líquido y de 1. después, con 500 c.c. de solución nutritiva. (En cada resiembra sucesiva aumentábamos en una unidad el subíndice).

De esta forma conseguimos tener un número considerable de cultivos y una buena masa de raíces derivadas todas de la primitiva nº 74. El sujeto sobre el que íbamos a realizar nuestras observaciones no podía ser más homogéneo y disponíamos de él en abundancia.

Desde la siembra inicial (el 30-X-951) hemos seguido y seguimos resembrando periódicamente -cada mes o más tarde aún cuando se trata solo de conservar la cepa- para disponer siempre de una reserva de este material genotípicamente homogéneo.

Preparación de una experiencia.

Iniciamos estas cuando llegamos a la 8ª resiembra de la cepa seleccionada, es decir, a los cultivos rotulados: 74₈.

Para preparar los inóculos que habíamos de sembrar en los medios nutritivos particulares de cada experiencia, pasamos a matraces de litro una cantidad pequeña de trama radicular de un cultivo de nuestra reserva. Al cabo de 10 - 12 días, si la temperatura ha sido la conveniente (32ª - 37ª), de la masa compacta que formaban las raíces al ser resembradas, irradian en todas direcciones ápices radiculares en activo crecimiento. (Considera_

Fig. 15



Fig. 1ª.

Matraz con raicillas a punto para ser cortadas y servir de inóculos en una experiencia.



Fig. 2ª.

Cultivo a punto de ser recogido, y el final de una experiencia.

razón con que ha sufrido, hacen que no sea importante una pequeña diferencia en el número de orden que realmente haga en la ramificación ya que esto ha de ser muy elevado. Además, el diámetro de las raíces de cualquier orden en los cultivos "in vitro" es muy homogéneo). Es el momento de aislarlos e introducirlos en los matrices preparados para la experiencia.

A veces no es fácil esta operación. Al pasar la masa de raíces del entraz en que están contenidas a la placa Petri donde cortamos y seleccionamos las raicillas, se juntan los ápices, se amontonan y los largos pelos absorbentes que las cubren profusamente hacen que se enreden en cuanto se tocan, resultando difícilísimo separarlos siendo probable que al intentarlo sufran algún traumatismo. Por esto es importante precisar el momento en que se ha de proceder a tomar los inóculos. Si las raíces que vamos a separar están demasiado cortas, son muy delicadas para que puedan sufrir las manipulaciones de la siembra y además, si las condiciones del medio nutritivo donde las introducimos se alejan bastante de las óptimas (caso general en la mayoría de las variantes experimentales) mueren con mucha frecuencia sin empezar a desarrollarse. Si, por el contrario, han crecido mucho, se enreden con gran facilidad según hemos visto y pueden por esta causa ser lesionadas. El interés sobrenadante es que los inóculos que empleemos sean sanos y fuertes y estén los meristemos intactos, pues de otra manera podrían conducirnos a resultados erróneos. (Hemos observado que si los inóculos no están en las condiciones adecuadas son mucho más sensibles a las condiciones desfavorables y se hallan mayores diferencias, a veces radicales, entre los resultados de una experiencia en relación con los cultivos testigo. El periodo de tiempo que hemos indicado (10 - 12 días) es el más conveniente para que hayan alcanzado los ápices la longitud adecuada si, como indicamos, la temperatura y demás factores fueron convenientes.

Para seccionar los ápices que han de servir de inóculos tras-

de él. En la que previamente vertemos parte del líquido del propio matraz y con tijeras que corten bien, vamos separando ápices de la misma longitud aproximadamente. La que más frecuentemente hemos utilizado es la de 30 mm. aunque en ocasiones hemos sembrado raíces desde 10 hasta 60 mm. -para medirlas colocamos un trozo de papel milimetrado debajo de la placa Petri-. La masa de estos ápices es pequeña, pesando 0,2 - 0,5 mg. en seco.

Cuando tenemos aislados un número conveniente de ápices procedemos a sembrarlos.

Siembra.

Previamente al seccionamiento de las raíces, hemos dispuesto sobre la mesa de siembras los matraces que contienen los medios nutritivos experimentales. (Fueron preparados cuando se vió que las raíces que habíamos de sembrar se hallaban en condiciones de desarrollo adecuado).

Cada matraz está numerado. Hemos seguido una numeración correlativa a lo largo de todas las experiencias, alcanzando los últimos cultivos el número 2.960.

De cada variante experimental preparamos 1 l. que distribuimos en 20 matraces de 125 c.c. de capacidad. El número de variantes que solemos poner simultáneamente es de cuatro a las que siempre acompaña una serie de cultivos *(el medio de White, el que llamamos)* testigo en W I normal lo que hace un total de 100 matraces.

En algunos casos, por las condiciones de la experiencia, ha sido preciso poner simultáneamente más variantes (por ej. en la observación de efecto del pH). En estas ocasiones, como la siembra de más de 100 matraces en una sesión resulta fatigoso, hemos dividido la experiencia en dos siembras sucesivas poniendo solamente 50 (10 matraces) de cada variante en lugar de los 20 que sembramos normalmente.

Colocamos los matraces sobre la mesa dispuestos de delante

Introducimos un ápice en cada matraz de una serie transversal (es decir, en cada uno de los matraces terminados en la misma cifra y de los cuales corresponden dos a cada medio) procurando que sean lo más iguales posibles. Al sembrar la segunda serie comenzamos por el extremo que la vez anterior habíamos sembrado el último. De esta forma pretendemos evitar y neutralizar los efectos de una selección involuntaria de los inóculos dentro de la serie, que pudiera originar el que los ápices con mayor vitalidad recayeran siempre en un mismo medio. Los ápices con que sembramos una serie proceden siempre del mismo matraz de reserva con objeto de evitar posibles diferencias debidas a que las condiciones ambientales no hubieran sido exactamente iguales para todos y pudieran tener más vitalidad las raíces de unos que las de otros.

Tratamiento ulterior de los cultivos.

Una vez sembrados, colocamos los matraces en la cámara oscura a la temperatura de 32 - 37° C. Cuando en alguna ocasión descendió la temperatura hasta 25° el crecimiento fué nulo. Si se eleva después, las raíces vuelven a crecer, pero no se recuperan si el descenso fué por debajo de los 25° C. /Dawson (17) halla como temperatura mas favorable para el cultivo de las raíces de tabaco una alternancia de 24° y 37° C. durante periodos de 3 - 4 dias. También Hildebrandt y colaboradores (39) ven que los tejidos de tabaco en cultivo requieren una temperatura bastante elevada (26° - 32° C.)/

Al cabo de tres semanas o un mes renovamos por primera vez la solución nutritiva pasando la masa de raíces de cada matracoite a solución fresca en mayor cantidad y en matraz también mayor (500 c.c. de capacidad el matraz con 250 c.c. de líquido). Al renovar por segunda vez, aproximadamente al mes de haber hecho el primer cambio de líquidos, pasamos las raíces a matraces de litro con

Para los medios especiales destinados a las observaciones de p H. y de sales amón cas, el tratamiento de los cultivos fué algo diferente. Renovamos la solución semanalmente y recogimos las raíces a los dos meses de iniciadas las experiencias.

Cuando un matraz se contaminaba accidentalmente o si un índice no se desarrollaba (siempre que los restantes de su misma variante experimental hubieran crecido y se viera claramente que el comportamiento de aquel era totalmente anómalo, debido probablemente a que el meristemo se lesionó al sembrarlo) despreciábamos toda la serie de cultivos que se sembró con él.

Para compensar los cultivos que retirábamos se habían puesto 20 matraces de cada variante. De esta manera nos asegurábamos el disponer de 10 cultivos de cada medio, por lo menos, en el momento de recogerlos, perfectamente equivalentes por su origen y condiciones los de todas las variantes.

Cuando un medio se apartaba bastante de las condiciones óptimas y las raíces crecidas en él nos proporcionaban poca masa, en la repetición de la experiencia poníamos bastantes más cultivos de esa variante con objeto de poder reunir materia seca suficiente para las determinaciones que después hubiéramos de hacer. Esto siempre que, aunque pequeño, fuera evidente el crecimiento. Si en la primera siembra veíamos que las raíces de un medio no crecían nada, o si lo hacían era en proporción tan insignificante que no había aumento apreciable de masa, en la repetición no aumentábamos el número de cultivos de este medio ya que nos dábamos cuenta de que evidentemente no podríamos obtener suficiente cantidad de raíces para ulterior análisis de las mismas. (Únicamente en casos de medios que resultaron muy desfavorables pero que estimamos de especial interés, hemos pretendido, mediante un elevado número de cultivos, obtener, aunque poca, alguna masa -caso del p H y de los cultivos con sales de amonio-).

puesto por

Agua destilada. —————	1.000 c.c.
Nitrato cálcico. —————	0,142 gr.
Sulfato magnésico. —————	0,073 "
Nitrato potásico. —————	0,081 "
Cloruro potásico. —————	0,065 "
Fosfato monopotásico. —————	0,012.5 "
Sulfato férrico. —————	0,002.5 "
Jacarosa. —————	20 "
Extracto de levadura. —————	20 c.c.

Sobre este medio, al que llamaremos medio normal o "standard" y en el que realizamos los cultivos testigo de cada siembra, establecimos las distintas variantes para la mayoría de las experiencias:

Efecto de las condiciones nutritivas generales, concentración de azúcar, acción de las sales fundamentales y acción de la piridina y ácido nicotínico.

Para la observación de la influencia del pH utilizamos el medio de Arnon, Fratzke y Johnson (.) diluido y complementado con las sustancias necesarias para nuestras raíces de manera que quedaba la siguiente composición:

Agua bidestilada. —————	1.000 c.c.	
Fosfato monopotásico. —————	0,008.16	gr.
Sulfato potásico. —————	0,052.3	"
Nitrato potásico. —————	0,202	"
Nitrato cálcico. —————	0,065.6	"
Sulfato magnésico. —————	0,049.3	"
Cloruro potásico. —————	0,040	"
Humato de hierro. —————	1 c.c.	(. .)

Para la comparación de nitrógeno nítrico y amónico utilizamos las soluciones de Arnon (2) diluidas 4 veces y adicionadas de los componentes necesarios, quedando integradas por:

A) Solución con sales amónicas

Agua bidestilada. _____	1.000 c.c.
Sulfato magnésico. _____	148,8 mg.
Sulfato potásico. _____	63,3 "
Fosfato monocalcico. _____	117 "
Sulfato cálcico. _____	64,5 "
Sulfato amónico. _____	66 "
Cloruro potásico. _____	40 "
Tartrato férrico. _____	1 c.c. de una sol. al 0,5 %
Extracto de levadura. _____	20 c.c.
Sacarosa. _____	20 gr.

B) Solución con nitratos

Agua bidestilada. _____	1.000 c.c.
Sulfato magnésico . _____	184,8 mg.
Sulfato potásico. _____	43,5 "
Fosfato monocalcico. _____	87,8 "
Fosfato monopotásico. _____	34 "
Nitrato cálcico. _____	82 "
Cloruro potásico. _____	40 "
Extracto de levadura. _____	20 c.c.
Sacarosa. _____	20 gr.
Tartrato férrico. _____	1 c.c. de sol. al 0,5 %

Finalmente, para la iniciación de los cultivos de Nicotiana glauca Gr. y Nicotiana sylvestris Spog y Com. utilizamos también el medio de Morel (50) ligeramente modificado que habíamos empleado anteriormente para cultivos de raíces de berenjena (3).

Lleva la siguiente composición:

Sulfato magnésico. —————	125	"
Fosfato monopotásico. —————	125	"
Cloruro férrico. —————	1	"
Tiamina. —————	10 ⁻⁶	"
Piridoxina. —————	10 ⁻⁶	"
Ac. nicotínico. —————	10 ⁻⁶	"
Pantotenato sódico. —————	10 ⁻⁶	"
n-inositol. —————	10 ⁻⁴	"
Glucosa. —————	30 gr.	

Para la preparación de los medios de cultivo utilizamos soluciones independientes de cada una de las sales a una concentración 1.000 veces superior a la del medio "standard", que se diluyen y juntan en la proporción conveniente en el momento de su utilización.

Los medios ya preparados se distribuyen en los matraces correspondientes y son esterilizados en autoclave a 1 atmósfera sobre la normal durante 20' cuando se trata del medio W I o de sus variantes. Los otros se esterilizaron a menor presión (1/4 de atm.) y durante 40'. *En algún caso esterilizamos por filtración.*

Las sales que utilizamos tenían diversa procedencia: "Merck", "Probus", "Gohe", "Panreac", "Quimipur". Su distinto origen acaso pudiera tener importancia para los resultados obtenidos, más como a cada experiencia le ha acompañado una serie de cultivos testigo en el medio normal preparado en las mismas condiciones, este inconveniente quedaba subsanado. Para comparar efectos en dos experiencias distintas tampoco era inconveniente puesto que en estos casos reducíamos los valores hallados a los valores medios comunes para los testigos.

(.) El extracto de levadura se preparó poniendo 0,5 gr. de levadura medicinal estabilizada "El Aguila" en 100 c.c. de agua, hirviendo durante 20' y filtrando. Del filtrado se tomaron los 20 c.c.

Hoover ().

El procedimiento es el siguiente:

Se prepara primero humato potásico comenzando por poner 300 c.c. de H_2SO_4 concentrado al que se añade agua hasta los 1000 c.c. y 150 gr. de sacarosa. Se calienta en un matraz muy grande (6 litros) a 115°C , durante 2 - 3 horas y después se centrifuga, se lava la parte sólida resultante con agua destilada y se vuelve a centrifugar.

Se neutraliza entonces esa parte sólida con KOH N x 18 hasta un p H : 9 con lo cual se disuelve.

Se centrifuga de nuevo y al líquido se le añade H_2SO_4 concentrado hasta llegar a p H : 3 con lo cual se vuelve a formar un precipitado.

Se vuelve a centrifugar, lavar el precipitado con agua y a centrifugar de nuevo.

Se añade otra vez KOH 18 N hasta p H: 9 y se vuelve a centrifugar.

Precipitar de nuevo el humato añadiendo H_2SO_4 hasta p H : 3.
Centrifugar.

Lavar dos veces añadiendo agua destilada y centrifugar cada vez.

Añadir KOH 18 N hasta p H : 7.3

Dejar pasar varios días hasta que se estabilice el p H y ajustar entonces a p H : 7.

Tenemos así humato potásico.

Se analiza entonces para determinar la concentración tomando 5 c.c. y precipitando con H_2SO_4 centrifugando, lavando dos veces con agua destilada para quitar el K_2SO_4 formado y centrifugando cada vez.

Tenor el precipitado en estufa a 100°C durante toda la noche para desecar y pesar al día siguiente.

(En nuestro caso hallamos 141 mg. en los 5 c.c.)

Se diluye después la solución de forma que quede la concentración adecuada para que adicionando 1 c.c. pongamos la misma cantidad de Fe que con los 2.5 mg. de sulfato férrico que lleva el medio W I.

Cuando al final de una experiencia (Fig. 2a) recogemos la masa de raíces formada en los distintos matraces, las colocamos sobre papel de filtro plegado varias veces con objeto de que pierdan el agua que en gran ^{parte} ~~porción~~ queda retenida entre el fieltro que forman raicillas y pelos absorbentes. Pesamos entonces la masa de cada cultivo por separado.

Es muy difícil precisar el momento en que el agua que pierde la raíz deja de ser la retenida exteriormente por leyes mecánicas o comienza a ser agua de constitución del órgano. Por esto damos poco valor a los datos obtenidos al pesar en fresco las raíces y muchas veces hemos prescindido de esta operación. (Desde luego, las tramas radiculares grandes acusan proporcionalmente mayor diferencia entre los pesos en fresco y en seco que las raíces menos desarrolladas, lo que nos habla en favor de una retención mecánica del agua del medio ambiente.

Enjugadas y pesadas las pasamos a estufa de desecación donde permanecen durante 48 horas a 60° C. Una vez secas son pesadas de nuevo individualmente, hallando la media de la masa de diez cultivos.

Pesadas, las pulverizamos en mortero de vidrio juntando las raíces crecidas en un mismo medio y homogeneizando bien el polvo resultante. Esto lo guardamos en un pesafiltros dentro de un desecador con cloruro cálcico.

Según Dawson (17) la nicotina en los cultivos de raíces de tabaco difundía al líquido ambiente. Por esta razón hemos conservado todos los medios gastados por los que pasó una raíz. Procedimos de la siguiente manera:

Después de renovar la solución de los cultivos por primera vez, mezclamos los caldos gastados correspondientes a todas las raíces de una misma variante experimental y conservamos una fracción

dad en sitio fresco. Hacemos lo mismo con los caldos de la segunda renivación que guardamos de la misma manera. Cuando, al final de la experiencia, recogemos la masa de raíces, mezclamos los líquidos de igual forma y guardamos el equivalente a una raíz. Mezclando los caldos de las tres veces tendremos en el total del líquido la media aritmética materializada de la nicotina que hayan podido verter al medio de cultivo las raíces de una misma variante.

Desarrollo de las raíces

Lo estimamos en peso seco y damos también, en la mayoría de los casos, los valores para peso fresco (que según hemos hecho observar más arriba creemos no son datos muy seguros).

En los resultados de cada experiencia encontramos casi siempre dos series de valores para el peso en seco. Una de estas series, más amplia, se refiere al peso medio absoluto hallado para la totalidad de los cultivos de una misma variante experimental. La otra serie, que comprende menos datos, da los valores medios para las raíces que se utilizaron en las determinaciones de nicotina y nitrógeno, para lo que seleccionamos solo las obtenidas en algunas variantes y además estos valores han sido reducidos a un valor del testigo común para todas las experiencias. Este valor es la media de los pesos medios de todos los cultivos en WI que sirvieron de testigo en cada siembra. De esta forma pueden ser comparados los resultados obtenidos en experiencias distintas.

Formación de alcaloides

Determinamos alcaloides globales que estimamos como nicotina.

La determinación no la hacemos en todos los cultivos sino que seleccionamos las variantes más significativas de cada experiencia.

Hacemos investigación de la nicotina en el polvo de las raíces desecadas y en el líquido de cultivo que las contiene.

Consideramos en los resultados los valores siguientes:

Tanto por ciento en peso de materia seca de la nicotina presente en el polvo de las raíces.

Tanto por ciento de la nicotina del líquido referido a peso seco de la raíz correspondiente.

Tanto por ciento total (La suma de los dos valores anteriores)

Nicotina total en el polvo de las raíces. La expresamos en milésimas de miligramo.

Nicotina total en valor absoluto (La suma de los dos valores anteriores).

Relación entre la nicotina presente en el líquido y la total.

La expresamos en tanto por ciento de la primera con relación a la segunda.

Contenido en nitrógeno

Hicimos la determinación sobre los cultivos seleccionados o los que habíamos hecho las de nicotina.

Consideremos y consignemos:

1º. Valores absolutos para:

Nitrógeno total del polvo de raíces desecadas, hallado directamente por análisis. Lo expresamos en milésimos de miligramo.

Nitrógeno alcaloídico del polvo. Determinado por cálculo a partir de la nicotina de la raíz. Expresado en γ

Nitrógeno alcaloídico presente en el líquido. Determinado también por cálculo y expresado en γ como los anteriores.

Nitrógeno alcaloídico total. Suma de los dos anteriores.

Nitrógeno total. El del polvo más el alcaloídico del líquido.

Nitrógeno no alcaloídico. El del polvo menos el alcaloídico del polvo.

2º. Porcentajes en peso seco para los valores anteriores.

3º. Relaciones entre las diferentes clases de nitrógeno.

Relación entre nitrógeno alcaloídico y no alcaloídico. Expresada en tanto por ciento del primero con relación al segundo.

Relación entre nitrógeno alcaloídico y nitrógeno total. Expresada en tanto por ciento del primero con relación al segundo.

Relación entre nitrógeno alcaloídico del polvo y total del polvo. Expresada como las anteriores.

Hemos considerado que el nitrógeno alcaloídico correspondiente a la nicotina presente en el líquido de cultivo, es nitrógeno que asimiló la raíz. Por eso lo tenemos en cuenta al hablar de nitrógeno-

no mencionados por considerar que comprenden no solo el nitrógeno albuminoideo sino la fracción de nitrógeno orgánico soluble.

Tanto en los datos referentes a nicotina, como en los del nitrógeno, al dar los porcentajes consignamos dos valores. Uno es el obtenido realmente para el cultivo correspondiente. El otro, al lado suyo y entre paréntesis, se refiere al mismo dato reducido en relación con un valor medio común de aquel concepto para todos los cultivos testigo. (Al hablar del peso ya hicimos referencia a esto). Hemos hallado la media de los valores obtenidos para peso, nicotina total y nitrógeno total del polvo en todos los testigos de las diferentes experiencias y después reducimos el valor correspondiente hallado en cada variante experimental a ese valor medio del testigo. De esta forma pueden ser comparados los resultados obtenidos en distintas experiencias.

Los valores medios de los cultivos testigo fueron:

Peso seco. ————— 139,9 mg.

Tanto por ciento de nicotina total.— 3,2

Tanto por ciento de nitrógeno en el
polvo. ————— 3,82

Para los gráficos hemos seleccionado los valores que creemos más interesantes.

Utilizaremos un micrométodo fotocolorimétrico basado en la coloración amarilla que da la nicotina (y en general todos los alcaloides con núcleos de la piridina libre) con el bromuro de cianógeno en presencia de una amina aromática. La coloración es proporcional a la concentración de nicotina -si las demás condiciones son las mismas- (ley de Lambert-Beer).

Esta reacción fué observada primeramente por König y utilizada después por Latta y Lorscheek y luego por Clarkwood para la determinación de nicotina en las hojas de tabaco. (Referencia de H. Cornick y Smith (47)). El procedimiento es muy apropiado para la estimación de pequeñas cantidades del alcaloide habiéndose utilizado con fines toxicológicos (Cornick y Smith, (ibid)).

Nosotros seguiremos la técnica particular de Worle y Becker (.).

Investigamos la nicotina tanto del polvo de las raíces secadas como del líquido de cultivo en que vivieron.

Para cada muestra se hicieron tres determinaciones y en caso de obtener cifras poco concordantes repetimos las tres.

Para el polvo tomamos de 5 a 10 mg. cada vez. Del líquido 4 c.c.

Para liberar la nicotina tratábamos con NaOH en solución saturada de CHNa y destilábamos a 168 C, recogiendo el destilado sobre la solución de anilina. Después añadíamos el bromuro de cianógeno.

El color desarrollado en la reacción era medido con un espectrofotómetro "Beckmann", utilizando la longitud de onda de 490 mμ para la que es máxima la absorción.

Previamente a las determinaciones construimos la curva-patrón correspondiente haciendo la reacción con cantidades de nicotina

(.) E. Worle y H.W. Becker, Bioch Z. 313, 182 (1942). (Nos fué comunicada amablemente por el Dr. Serrano de la Universidad de Barcelona).

esto preciso hacer lecturas a cortos intervalos para captar el máximo de absorción de luz. Este tenía lugar, en unos casos, a los 10 minutos de iniciada la reacción, en otros llegaba a tardar hasta 30'. Hemos creído observar una cierta relación inversa entre cantidad de nicotina y tiempo transcurrido hasta el máximo de absorción de luz. La temperatura ambiente parece que también influye bastante en la rapidez de la reacción. Por tanto es preciso empezar a leer a los 5 ó 6 minutos para no correr el riesgo de que se pase al máximo.

Hemos probado a medir directamente la nicotina del líquido de cultivo sin tratamiento con álcali ⁿⁱ ~~sin~~ previa destilación. La reacción es positiva y da resultados algo superiores a la estimación con destilación previa.

Verificando la reacción en el líquido virgen nos dió una pequeña absorción de luz que correspondía exactamente a la diferencia por exceso hallada cuando no destilábamos. (Debemos recordar que el medio nutritivo lleva extracto de levadura y por tanto contendrá ácido nicotínico, tiamina, etc., compuestos que llevan el núcleo de la piridina). Restando esta pequeña absorción de la que resulta en los líquidos gastados, cuando se hace sobre ellos la reacción directamente, obtuvimos el mismo valor para el alcaloide que destilando.

Creemos, en consecuencia, que es posible hacer la determinación de esta forma lo que supondría bastante simplificación, importante si se han de hacer estimaciones en serie para las cuales resulta un poco pesado este método.

En los análisis hechos así, el máximo de absorción de luz se alcanzaba, con mucha regularidad, a los 20' de haber añadido el bromuro de cianógeno.

Investigamos nitrógeno total por micro-Kjeldahl (por tanto, no valoramos el nitrógeno nítrico) utilizando como catalizador una mezcla de selenio, sulfato mercuríco y sulfato potásico () y destilando por arrastre con vapor de agua en presencia de sosa y sulfuro sódico.

El destilado se recogía sobre una solución saturada de ácido bórico y se valoraba el amoniaco con CHH N/40 utilizando como indicador rojo de metilo adicionado de azul de metileno con lo que el viraje se hace muy visible y claro.

De cada muestra se hicieron tres determinaciones tomando cada vez de 20 - 30 mg. de polvo.

VII.- DESCRIPCION DE LAS EXPERIENCIAS

EXPERIENCIA 1ª

Condiciones nutritivas generales

Intentamos ver en acción disponiendo varios cultivos en el medio básico WI que fueron recogidos al cabo de distintos tiempos transcurridos, para unas raíces, en condiciones óptimas (renovación de la solución nutritiva en la forma en que siempre lo hacíamos); para otras, en condiciones precarias (no renovamos el líquido de cultivo).

Preparamos 120 matrascitos que fueron inoculados con una raíz de unos 30 mm. cada uno.

Al cabo de un mes recogimos las raíces crecidas en 40 de estos matrascos (las designaremos 1a), renovamos la solución nutritiva de 30 pasándolas a matrascos de 1 l. con 250 c.c. de líquido y dejamos sin tocar los 50 restantes.

Al cabo de dos meses de cultivo recogimos las raíces de 30 de los matrascitos a los que no se les había renovado el medio. Iñocaban en el mismo líquido dos meses (las llamaremos 2a). Recogimos también 10 de los cultivos que habían sufrido una renovación (2a').

Quedaban entonces 20 matrascitos pequeños sin renovación y 20 grandes a los que habíamos renovado una vez. A 10 de estos se les cambió de nuevo el líquido pasando las raíces a matrascos de litro conteniendo 500 c.c. de solución.

A los tres meses de iniciada la experiencia recogimos todos los cultivos que quedaban que eran:

20 cuyo líquido no se había tocado. Los designaremos con 3a.

Estas raíces habían soportado condiciones en extremo desfavorables puesto que habían vivido tres meses en sólo

y habían dispuesto en consecuencia de elementos nutritivos mucho más abundantes.

10 cuya solución nutritiva se había renovado dos veces (3 m'') y se encontraban por tanto en condiciones nutricionales mucho mejores.

Disponíamos así de raíces con distinto tiempo de cultivo (1, 2 y 3 meses) en condiciones favorables unas, las 1m, 2m', 3m', y 3m'' (renovación y abundancia del medio) y procuramos otras, 1m, 2m y 3m (las que no habíamos renovado) y raíces de la misma edad (tiempo de cultivo) que habían recibido tratamiento distinto:

3 m (sin renovar ninguna vez)

3 m' (con una renovación)

3 m'' (con dos renovaciones).

Resultados obtenidos.

Efectos sobre el desarrollo.

Cuadro nº 1 y gráficos números 1 y 2.

Como vemos por el cuadro 1º y gráficos números 1 y 2 el peso en seco es mayor en cualquiera de los cultivos de tres meses, incluso en los 3 m, que en los de menos tiempo que tuvieron mejores condiciones (2 m'). Las raíces continuaron creciendo y aumentando su masa aún en las condiciones más desfavorables.

Hay una enorme diferencia de peso entre los cultivos de la misma edad a los que se les renovó el líquido en que vivían y los que no fueron renovados.

Si comparamos los pesos en fresco y en seco de los cultivos 1m, 2m y 3m vemos como aumentó relativamente más el peso en seco que en fresco, a lo largo del tiempo, con las condiciones desfavorables.

Efectos sobre la formación de nicotina.

Cuadro número 2 y gráficos números 2, 3, 4 y 5.

C U A D R O N o 1

EFECTO DE LAS CONDICIONES CULTIVAS EN ELLOS SOBRE EL DESARROLLO.

Cultivos	Peso medio en fresco en mg.	Peso medio en seco en mg.	Peso medio en seco reducido a VI centn. (en mg.)
1 m	213,8	14,7	(16,5)
2 m	220,4	36,6	(41,1)
2 m'	434,8	47,1	(52,9)
3 m	367	51,4	(57,7)
3 m'	1336	98	(110,5)
3 m''	1561	124,6	(139,9)

ACCION DE LAS CONDICIONES NUTRITIVAS GENERALES

VALORES PARA NICOTINA

Medios	Peso en g o red. en mg.	Porcentajes de nicotina en peso.						Valores absolutos en			% de nicotina en el líquido con relación a total
		En el polvo.		En el líquido.		Total.		Polvo.	Líquido	Total	
		Valor real	Valor reducido	Real	Reducido	Real	Reducido				
1 m	(16,5)	1,35	(1,43)	0,53	(0,56)	1,88	(1,99)	219	86	305	28,2
2 m	(41,1)	1,25	(1,32)	0,65	(0,67)	1,90	(2,01)	542	284	826	34,2
2 m'	(52,9)	1,1	(1,16)	1,11	(1,17)	2,21	(2,34)	517	525	1043	50,2
3 m	(57,7)	1,08	(1,14)	0,65	(0,68)	1,73	(1,83)	555	338	893	37,5
3 m'	(110,5)	1,52	(1,61)	1,86	(1,97)	3,38	(3,59)	1496	1835	3331	55
3 m''	(139,9)	1,28	(1,36)	1,73	(1,83)	3,01	(3,2)	1595	2168	3763	57,5

mayor en 3 m que en 2 m a pesar del menor porcentaje. Las raíces por tanto formaron nicotina a lo largo de todo el tiempo de cultivo en condiciones desfavorables.

Si observamos los cultivos 1m, 2m' y 3m'' vemos como el porcentaje de nicotina total aumenta progresivamente. La cantidad total de nicotina aumenta mucho:

En los cultivos de la misma edad y distinto tratamiento, 3m, 3m' y 3m'', hallamos diferencias considerables en el porcentaje total. Se eleva mucho de 3 m a 3m' y desciende de 3m' a 3m''. La cantidad total de nicotina por cultivo era algo mayor en 3m'' que en 3m' pero su aumento no fué proporcional al de peso.

En resumen, observamos cómo la raíz, con distintas condiciones externas, continua formando nicotina a lo largo del tiempo. Que forma una cantidad absoluta en condiciones óptimas que desfavorables. Pero que no hay relación exacta entre crecimiento y formación de alcaloide, de donde resulta a veces un descenso en el porcentaje a pesar de existir aumento de la cantidad absoluta.

Si atendemos a la distribución de la nicotina entre la raíz y el líquido de cultivo observamos que va aumentando la proporción en que se encuentra en el líquido con relación al porcentaje total, tanto con la renovación del líquido de cultivo como con el tiempo. La curva que representa el porcentaje de la nicotina presente en el líquido con relación al total es ascendente en todos los casos (cultivos de diferente edad en condiciones óptimas, de diferente edad en condiciones desfavorables, de la misma edad en diferentes condiciones) presentando la mayor pendiente en los cultivos de diferente edad y condiciones favorables. En el caso de los cultivos 3m'', en los que el porcentaje de nicotina total disminuía con relación a 3m', la relación $\frac{\text{nicotina en líquido}}{\text{nicotina total}}$ seguía aumentando.

Esta relación $\frac{\text{nicotina en líquido}}{\text{nicotina total}}$ debe ser significativa más su significación es difícil de comprender puesto que parece indicar-

tidad se hace proporcionalmente mayor si las condiciones son favorables.

La cantidad de nicotina por ciento en peso en el polvo resulta menos significativa. Por un lado vemos que en los cultivos de dos meses hay mayor proporción en los 2m que en los 2m' mientras que en los de tres meses observamos lo contrario, mayor proporción en los que fueron renovados que en los que no lo fueron. Se reflejan mejor por tanto las condiciones ambientales sobre la nicotina que la raíz expulsa que sobre la que guarda.

Efecto sobre el contenido en nitrógeno

Cuadros números 3 y 4 y gráficos números 2, 6, 7 y 8.

Consideraremos primero los cultivos 3m, 3m' y 3m''. Se ve como el nitrógeno total aumenta mucho en porcentaje con la renovación de la solución nutritiva. El aumento es mucho mayor al pasar de los cultivos sin renovar a los renovados una vez que de estos a los renovados dos veces.

El nitrógeno total de que dispusieron los cultivos 3m fué sólo de 1895 γ . De este nitrógeno, 1773 γ era nitrógeno aportado por los nitratos. En la raíz se registra un total de 1225 γ . Debía tener entonces gran importancia el que la solución fuese renovada o no. En las raíces 3m' se registra un total de 3810 de nitrógeno y dispusieron de 10641 γ en la solución nutritiva. Al tenerle a su disposición abundante es lógico se note menos el efecto de la segunda renovación del líquido.

La proporción de nitrógeno que tomó la vía alcaloidea con relación al total, aumentó al renovar por primera vez, disminuyendo en los cultivos que fueron renovados dos veces.

Si observamos las gráficas de los cultivos de distinto tiempo en condiciones óptimas (nº 7 b) vemos aumenta ligeramente el porcentaje tanto de nitrógeno total como nicotínico, con el tiempo de culti-

ACCION DE LAS CONDICIONES CULTIVAS GENERALES.

VALORES PARA NITROGENO.

Porcentajes en peso.

Q U A D R O N º 3.

Modios	Peso seco reducido de 100 en 100 gr.	Nitrógeno total del polvo.		Nitrógeno aloloides del polvo.		Nitrógeno aloloides total.		Nitrógeno total		Nitrógeno no aloloides.	
		Valor real	Valor teórico	Real	Reducido	Real	Reducido	Real	Reducido	Real	Reducido
1 m	(16,5)	3,63	(3,63)	0,25	-	0,35	-	3,73	-	3,37	-
2 m	(41,1)	2,47	(2,47)	0,25	-	0,38	-	2,60	-	2,21	-
2 m	(52,9)	3,81	(3,81)	0,19	-	0,38	-	4,00	-	3,62	-
3 m	(57,7)	2,27	(2,27)	0,18	-	0,30	-	2,38	-	2,08	-
3 m	(110,5)	3,55	(3,55)	0,26	-	0,58	-	3,87	-	3,28	-
3 m	(139,9)	3,82	(3,82)	0,22	-	0,52	-	4,12	-	3,59	-

(.) Las cifras entre paréntesis representan los valores reducidos al común para todos los testigos. Como en esta experiencia el valor hallado para 3m¹ (que equivale al testigo) coincidió con el valor medio de los cultivos testigo de todas las experiencias no fue preciso reducir los demás.

ACCION DE LAS COMPOUNDS NITRATIVAS CASIOLAS
VALORES PARA NITROGENO

Muestras	Peso seco en mg.	Valores absolutos en g						Relaciones entre las distintas clases de nitrógeno		
		Total en el polvo.	Alcoholados.			Nitrógeno total.	No alcoholados.	% de nitrógeno alcoholado en el total.	% de nitrógeno alcoholado en el total.	% de nitrógeno alcoholado en el total.
			En el polvo.	En el líquido.	Total.					
1 m	14,7	533	37,8	14,8	52,6	548,4	496	7,08	9,5	10,6
2 m	36,6	905	93,1	49	142,7	953	810	10,03	14,9	17,6
2 m'	47,1	1794	89,4	90,7	180,1	1885	1705	4,9	9,5	10,5
3 m	51,4	1167	95,9	58,35	154,2	1225	1071	8,2	12,5	14,4
3 m'	98,4	3493	258,5	317,2	575,7	3810	3235	7,4	15,1	17,7
3 m''	124,6	4760	275,7	374,7	650,4	5134	4484	5,7	12,6	14,5

En el gráfico correspondiente a los cultivos 1m, 2m y 3m, es decir, los de distinto tiempo sin renovación del líquido (nº 7 a) vemos como el porcentaje de nitrógeno total desciende mucho con el tiempo. La proporción de nitrógeno nicotínico con relación a no nicotínico aumenta de los cultivos 1m a los 2m, pero luego disminuye al hacerse las condiciones mas desfavorables.

En el gráfico nº 2 podemos observar reunidos efectos sobre nicotina y nitrógeno en relación con el peso seco de la totalidad de los cultivos, ordenados los pesos de menor a mayor.

En los gráficos 5 y 8 vemos distribución de nicotina y nitrógeno en la totalidad de los cultivos. Las oscilaciones de la curva de nicotina total nos hablan de su descenso en los casos de condiciones desfavorables. Su reparto entre polvo y líquido nos hace ver cómo se asemeja mucho la curva de nicotina en líquido a la de nicotina total. La de relación líquido a total nos deja ver cómo asciende tanto con el tiempo como con las condiciones favorables (Gráfico nº 5).

La de nitrógeno total muestra grandes oscilaciones expresivas de las condiciones desfavorables. La de relación nicotínico a no nicotínico, en conjunto resulta casi inversamente proporcional a la anterior, es decir, en condiciones desfavorables de nutrición, la raíz de tabaco desvía proporcionalmente más nitrógeno hacia la formación de alcaloides (Gráfico nº 8)

Es difícil interpretar los resultados de esta experiencia, muy compleja, ya que en los cultivos en que no se renovó la solución nutritiva había, no sólo escasez de alimentos, sino falta de aire (matraz muy pequeño) posibles variaciones del pH, acumulación de productos de desecho, etc.

...que se han suministrado, en forma de solución nutritiva, a los
Rica de los elementos integrantes de la solución nutritiva WI.

Reducción de aniones.

Preparamos medios nutritivos con proporciones: $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{25}$ y $\frac{1}{50}$ de la concentración normal, para cada uno de los iones independientemente.

Designamos a los medios correspondientes con el signo (-) una, dos o tres veces repetido, antepuesto al conjunto de símbolos del anión para indicar la reducción creciente. Así, por ejemplo, para nitratos tendríamos: $-NO_3$ (reducción a $\frac{1}{10}$), $--NO_3$ (reducción a $\frac{1}{25}$), $---NO_3$ (reducción a $\frac{1}{50}$).

Disminuimos en la misma proporción todas las sales que llevan el anión cuya acción nos interesa estudiar.

Resultados.

Efectos sobre el crecimiento

Cuadros nº 5 y gráfico nº 9.

La reducción de los distintos aniones influye considerablemente y de distinta manera sobre el desarrollo de las raíces de tabaco.

Una disminución moderada (a $\frac{1}{10}$) apenas se traduce: para los nitratos, en un ligerísimo descenso de peso; para los sulfatos, también en disminución de peso, más acentuada; en cambio, la reducción de cloruros y fosfatos le hace aumentar, más la de los últimos.

Si la concentración de las sales es solo $\frac{1}{25}$ ó $\frac{1}{50}$ de la normal, el efecto negativo de nitratos y sulfatos aumenta mucho progresivamente, mientras que para cloruros y fosfatos el crecimiento se hace menor que para la concentración $\frac{1}{10}$, aunque sigue siendo superior a la del medio "standard" con la reducción $\frac{1}{25}$ en los dos casos, y para fosfatos, incluso cuando los hemos reducido a $\frac{1}{50}$, concentración esta que para cloruros da un crecimiento aproximadamente igual que el medio normal.

El aumento de peso con la reducción de fosfatos iba acompañado por un aspecto de las raíces de gran vitalidad y lozanía, con

Medios.	Peso fresco en mg.	Peso seco en mg.
- NO ₃ '	1904,2	165
= NO ₃ '	1846,6	125
= NO ₃ '	829,5	71,9
- SO ₄ "	2336,3	148,1
= SO ₄ "	1178,8	108,5
= SO ₄ "	1212,5	88,3
- PO ₄ '''	3173,1	280,1
= PO ₄ '''	2450,8	210,5
= PO ₄ '''	2291,9	183,5
- Cl'	2103,4	202,3
= Cl'	2052,2	186
= Cl'	1977,8	164,6
WI	1962,8	166,4

los de peso en seco excepto para sulfatos que tienen una curva un poco anormal. (Más ya sabemos que a los datos de peso en fresco sólo puede adjudicárseles un valor muy relativo).

Ordenados los cultivos según pesos decrecientes tendríamos la siguiente serie cuando la reducción es de $\frac{1}{50}$: $PO_4''' > WI > Cl' > SO_4'' > NO_3'$.

Efecto sobre el contenido de nicotina

Seleccionamos para las determinaciones de nicotina y nitrógeno las raíces crecidas en los medios con reducción a $\frac{1}{50}$.

Resultados.

Cuadro número 6 y gráficos números 10 y 12.

El efecto mas marcado sobre la proporción total de nicotina lo producen la reducción de nitratos y cloruros; negativo en el primer caso, positivo en el segundo. Mucho más limitada es la acción de sulfatos y fosfatos, negativa también la de los primeros y positiva la de los segundos. Ordenados los cultivos en los distintos medios en orden a su porcentaje de nicotina tendríamos la serie siguiente: $Cl' > PO_4 > WI > SO_4'' > NO_3'$.

La distribución de la nicotina entre el polvo de la raíz y el líquido de cultivo nos hace ver que, como en casi todos los casos estudiados, hay mayor cantidad en el líquido que en la propia raíz. Si observamos la curva de la proporcionalidad nicotina en el líquido/ nicotina total, vemos que no es tan clara como para las experiencias de variación en intensidad de un mismo factor. En estos casos podemos ver como aumenta aquel porcentaje proporcionalmente al aumento de nicotina. Aquí nos falla para los sulfatos.

Por tratarse de factores distintos es natural que no hallemos una relación tan evidente. Pero de todas formas se observa que la proporción de nicotina en el líquido con relación a la total es superior al 50% en todas las variantes experimentales.

RESUMEN DE LA DISTRIBUCION DE ANIONES JUNTAS LA DISTRIBUCION DE NICOTINA

Modios.	Peso seco co redu- cido en mg.	Porcentajes de nicotina en peso seco.						Valores absolutos en g			Ciento por ciente de nicotina en el li- quido o en relacion al to- tal.
		En el polvo.		En el líquido.		Total	Polvo.	Líquido.	Total		
		Valor hallado	Requie- rido.	Halla- do.	Requie- rido.						
FeO_3	(66,5)	1	(1,14)	1,23	(1,41)	2,23	(2,56)	927	1144	2071	55,2
FeO_4	(74,3)	0,93	(1,07)	1,72	(1,97)	2,64	(3,04)	1058	1959	3017	64,9
FePO_4	(154,7)	1,2	(1,37)	1,75	(2,01)	2,95	(3,39)	2844	4166	7010	59,4
FeO_1	(138,4)	1,28	(1,47)	2	(2,2)	3,28	(3,77)	2715	4236	6950	60,9
VI	(139,9)	1,17	(1,34)	1,61	(1,85)	2,78	(3,2)	2507	3467	5974	58

más afecta al porcentaje total de N, asimilado por la raíz. La de las otras sales influye moderadamente, en sentido positivo en todos los casos.

Por su proporción de nitrógeno total podríamos ordenar los cultivos en los distintos medios según la serie siguiente:



La curva que expresa la relación $\frac{\text{nitrógeno alcaloideo}}{\text{nitrógeno no alcaloideo}}$ nos dice como la planta utiliza, proporcionalmente, una mayor cantidad de nitrógeno para formar alcaloides cuando contiene menos nitrógeno total. (Esto lo hemos observado también en otras experiencias).

La proporción, en peso, del nitrógeno nicotínico es muy parecida para todos los medios. En consecuencia, la del nitrógeno no alcaloideo es muy parecida a la de nitrógeno total.

Comparando entre sí y con la de pesos las curvas de porcentajes totales de nicotina y nitrógeno vemos un cierto paralelismo entre las dos últimas, ninguna relación con la de pesos (gráfico número 12).

CUADRO No 7

TRINUBIOLA DE LA REACCION DE NITROS POLVO AL CONTACTO CON NITROGENO
POHONTEJAS EN P.V.O.

Medios.	Poco soco reducido en %	Nitrogeno total del polvo.		Nitrogeno al- celado del polvo.		Nitrogeno al- celado total.		Nitrogeno total.		Nitrogeno no alcelado	
		% Halla- do.	Valor reducido.	% halla- do.	Valor reducido.	% halla- do.	Reducido.	% Halla- do.	Reducido.	% Halla- do.	Reducido.
= PO_3	(60,5)	2,4	(2,29)	0,17	(0,16)	0,38	(0,36)	2,6	(2,48)	2,18	(2,12)
= SO_4	(74,3)	4,01	(3,83)	0,16	(0,15)	0,45	(0,43)	4,3	(4,1)	3,7	(3,67)
= PO_4	(154,7)	4,08	(3,89)	0,20	(0,19)	0,51	(0,48)	4,3	(4,1)	3,7	(3,62)
= Cl	(138,4)	4,3	(4,11)	0,22	(0,21)	0,56	(0,53)	4,6	(4,39)	3,9	(3,86)
NT	(139,9)	4	(3,82)	0,20	(0,19)	0,48	(0,46)	4,2	(4)	3,7	(3,56)

EFECTO DE LA INMIXCION DE ANIONES SOBRE EL COMPLEJO NN.

Modios	Peso seco real en mg.	Total del polvo.	Alcaloides			Nitrógeno no total por el polvo.	Nitrógeno no alcaloides	Relaciones entre las distintas partes de nitrógeno.		
			En el polvo.	En el líquido.	Total.			% del nitrógeno alcaloides en el polvo	% del nitrógeno alcaloides en total.	% del nitrógeno alcaloides en no alcaloides
NO_3	97,7	2220	160,2	197,8	358	2417,8	2060	7,2	14,8	17,3
SO_4	113,8	4560	182,9	338,6	521,5	4898,6	4377	4,0	10,6	11,9
PO_4	237	9670	491,5	720,1	1211,6	10390	9178	5,0	11,6	13,2
Cl	212,1	9120	469,2	732,1	1201,3	9852	8651	5,1	12,6	13,8
WI	214,3	8570	433,3	599,3	1032,6	9169	8137	5,0	11,2	12,6

Habiendo visto en la experiencia de aniones el que la reducción a $\frac{1}{50}$ permitía un desarrollo apreciable de las raíces, en ésta nos limitamos a preparar medios con reducciones a $\frac{1}{10}$ y $\frac{1}{50}$ de la normal.

Como para los aniones, designaremos los medios con el símbolo del metal reducido, al que antepondremos los signos (-) ó (=) que tendrán el mismo significado que en la experiencia anterior.

Efecto sobre el crecimiento

Cuadro nº 9 y gráfico nº 43

Observamos como la reducción del Ca produce aumento del peso seco en todos los casos. La del K también le hace aumentar cuando lo reducimos a $\frac{1}{10}$, pero si la disminución llega a $\frac{1}{50}$ el peso comienza a hacerse menor que en el medio "standard".

La deficiencia de Fe produce los efectos mas visibles: una gran disminución del desarrollo. (En aparente desacuerdo con los datos existentes sobre la necesidad de este elemento en la planta completa).

En cuanto al Mg nos dió los resultados mas dudosos pues mientras una reducción moderada ($\frac{1}{10}$) parece hacia disminuir el crecimiento, resultaba este mayor que en el testigo si se acentuaba aquella hasta $\frac{1}{50}$. Esto si consideramos los valores medios totales de las dos veces que repetimos la experiencia. Considerada cada siembra particularmente, vimos un pequeño aumento del crecimiento en un caso y ligera disminución en el otro; pero en ambos los resultados parecían poco normales puesto que resultaba más acentuado el efecto -aumento en el primer caso, disminución en el segundo- para el medio -Mg que para el = Mg.

De todo lo cual parece deducirse que la reducción del Mg es indiferente para el desarrollo de la raíz.

Si ordenamos los cultivos en los distintos medios en orden a

Medios.	Pesos en fresco en mg.	Peso en seco en mg.
- K	2003	172
= K	1842	146,6
- Ca	2095	174,3
= Ca	2085	182,5
- Mg	1501	151,4
= Mg	1471	158,3
- Fe	1080	119,3
= Fe	1106	113,1
WI	1566	155,2

$\equiv \text{Ca} > \text{VI} > \equiv \text{Mg} > \equiv \text{K} > \equiv \text{Fe}$

Efecto sobre la formación de nicotina

Cuadro nº 10 y gráfico nº

La reducción de los diversos cationes influye bastante y de forma distinta sobre el porcentaje total de nicotina formada por la raíz.

La disminución del Fe hace aumentar su proporción, la de los demás la hace descender siendo el orden de influencia, de menor a mayor: $\text{K} < \text{Ca} < \text{Mg}$.

Por su proporción decreciente de alcaloide podríamos ordenar los cultivos en los distintos medios con arreglo a la serie:

$\equiv \text{Fe} > \text{VI} > \equiv \text{K} > \text{Ca} > \text{Mg}$

La cantidad de nicotina que se halla en el polvo varía muy poco de un medio a otro; es la vertida al líquido de cultivo la que más cuenta para el total. Pero las inflexiones de la curva de nicotina en el polvo, aunque muy suavizadas, son las mismas que las de la total y del líquido.

La curva de porcentaje: nicotina en líquido / nicotina total, sigue las mismas inflexiones que la de porcentaje total. Es decir, aumenta dicha relación con el aumento total de nicotina, lo mismo que vimos para la experiencia primera y que veremos para otras muchas.

Nos indica que, aunque aumente o disminuya bastante el porcentaje total de nicotina formada por los distintos cultivos, varía muy poco la que es retenida por la raíz.

Efecto sobre el contenido en nitrógeno

Cuadros números 11 y 12.

y gráficos números 14, 16.

La cantidad de nitrógeno es influida por los distintos medios tanto si consideramos el nitrógeno del polvo (total o alcaloídico),

Medios.	Peso seco reducido en mg.	Porcentajes de nicotina en peso.					Valores absolutos en g.			% de nicotina en el líquido con relación a total. Hella-Redu-rido.		
		En el polvo		En el líquido.		Total.	Polvo.	Líquido	Total			
		% hella-rido.	Redu-rido.	% hella-rido.	Redu-rido.							
= K	(128,8)	1,16	(1,10)	1,87	(1,72)	3,03	(2,83)	2060	3327	5387	61,7	(60,9)
= Ca	(156,5)	1,14	(1,08)	1,50	(1,37)	2,64	(2,46)	2460	3240	5700	56,8	(56)
= Mg	(138,7)	0,93	(0,98)	0,86	(0,94)	1,79	(1,95)	1278	1182	2460	48	(48,6)
= Fe	(74,6)	1,13	(1,20)	2,32	(2,55)	3,45	(3,76)	835	1720	2555	67,2	(68)
VI Parte = K, V, Ca	(139,9)	1,17	(1,11)	2,26	(2,07)	3,43	(3,2)	2256	4369	6625	65,8	(64,9)
VI Parte = Mg, V	(139,9)	1,05	(1,11)	1,88	(2,07)	2,93	(3,2)	1297	2614	3911	64,1	(64,9)

INFORMACIÓN DE LA REACCIÓN DE LOS NITRÓGENOS SOBRE EL CONSUMO EN N.
POICENAS EN 1950

Modios.	Peso so- co rodu- cido en mg.	Nitrógeno to- tal del poivo	Nitrógeno al- caloide en pel.	Nitrógeno al- caloide to- tal.	Nitrógeno total	Nitrógeno no alcaloides					
		Hollado	Reducido	Hollado	Redu- cido	Hollado	Redu- cido	Hollado	Redu- cido.		
= K	(128,8)	3,75	(4,02)	0,20	(0,18)	0,52	(0,44)	4,07	(4,31)	3,54	(3,88)
= Ca	(156,5)	3,25	(3,48)	0,19	(0,17)	0,45	(0,38)	3,5	(3,7)	3,05	(3,33)
= Mg	(138,7)	3,74	(3,85)	0,16	(0,18)	0,30	(0,37)	3,88	(4,03)	3,58	(3,33)
= Fe	(74,6)	3,63	(3,71)	0,19	(0,21)	0,59	(0,73)	4,03	(4,19)	3,43	(3,46)
VI pura K y Ca	(139,9)	3,56	(3,82)	0,20	(0,18)	0,59	(0,49)	3,95	(4,19)	3,35	(3,7)
VI pura K y Ca	(139,9)	3,71	(3,82)	0,16	(0,18)	0,40	(0,49)	4,03	(4,19)	3,54	(3,7)

INFLUENCIA DE LA INFLUENCIA DE LA CANTIDAD DE NITRÓGENO

Modos	Peso en mg.	Valores absolutos en g				Relaciones entre las distintas clases de nitrógeno.			
		Total del polvo	Alcoholídeo			% del nitró- geno alcohó- lico en el polvo.	% del nitró- geno alcohó- lico en el total del polvo.	% del nitró- geno alcohó- lico en el total del polvo.	% del nitró- geno alcohó- lico en el total del polvo.
			en el polvo	en el líquido	Total				
II K	177,6	6660	356	575,1	931	7235	6304	5,3 (4,6)	12,8 (11,5) 14,7 (13,1)
III Ca	215,8	7010	425,2	560	985	7570	6585	6 (5,3)	13 (11,7) 14,9 (13,3)
IV Mg	137,4	5140	220,7	204,3	425	5344	4919	4,3 (4,9)	7,9 (8,9) 8,6 (9,9)
V Pb	73,9	2680	144,3	297,2	441	2977	2536	5,4 (6,1)	14,8 (16,6) 18,9 (21,6)
VI Peróxido de Hg y Ca	192,8	6860	389,8	755	1145	7615	6470	5,7 (5)	15 (13,5) 17,7 (15,7)
VII Peróxido de Hg y Ca	138,5	5140	224,2	451,8	676	5592	4916	4,4 (5)	12 (13,5) 13,7 (15,7)

no) y resulta indiferente la del Fe.

En cambio es la reducción de este elemento la que más afecta, haciéndolo aumentar, al nitrógeno nicotínico, mientras que la de los demás cationes produce un ligero descenso.

En las relaciones de nitrógeno alcaloídico a no alcaloídico o a total existe paralelismo con la curva de nitrógeno alcaloídeo. Cuanto mayor es el porcentaje de este es mayor también su proporcionalidad con relación a las otras clases de nitrógeno.

Entre las curvas de nitrógeno total o nitrógeno no nicotínico y la de peso, no se descubre ninguna relación. En cambio, parece haber una cierta proporcionalidad inversa entre nitrógeno alcaloídeo y peso. Al menos para el Fe, cuya deficiencia origina el crecimiento es menor, es donde mas cantidad encontramos de Nicotínico en porcentaje en peso y donde mayor es su proporción con relación al total o al no nicotínico.

los distintos elementos de las sales componentes de la solución nutritiva WI, en relación con los datos que encontramos sobre importancia o acción de estos elementos sobre la planta de tabaco, veremos lo siguiente:

Con relación a influencia del N.

Está perfectamente de acuerdo la reducción en peso que hallamos con el aumento de desarrollo que se produce en el tabaco con los abonos nitrogenados.

El porcentaje de nicotina que no parece que aumente realmente con el abonado con nitratos en la planta en el campo, aún cuando se eleve el contenido global de la misma por aumento del desarrollo (James (1); Ciferri y Scaramuzzi (11); Amets (.); Lashuk (43). Para Mothes (53) las hojas de tabaco acumulaban nicotina incluso cuando les faltaba N.) en nuestro caso se ve afectado por la reducción del N del medio: hallamos una disminución real del porcentaje con la deficiencia de nitratos. El único dato de acuerdo con los nuestros es el de Lorrano (62) que ve que aumenta ese porcentaje en plántulas de tabaco tratadas con nitratos.

La reducción que observamos sobre el porcentaje total del N está de acuerdo con todas las referencias que vemos sobre este punto (Mc Evoy (48), Ciferri y Scaramuzzi (11)).

Con relación a influencia del P

Nuestros resultados no concuerdan con los de otros autores en cuanto efecto producido sobre el desarrollo. La carencia de fósforo parece determinar su reducción en la planta de tabaco (Ciferri y Scaramuzzi (11); ^{y se observa} aumento de peso con el abonado fosforado (James (1))). En nuestro caso, la disminución de los fosfatos influye favorablemente sobre el desarrollo.

(.) Citado de James (1).

= PO₄ no resulte deficitaria.

En cuanto al contenido alcaloideo, el efecto del abonado fosforado parece que es distinto según la planta de que se trate: hace aumentar su porcentaje en unas y disminuir en otras. Para el tabaco halla Leshuk (43) que la ausencia de P en la dieta produce aumento de los alcaloides. Nosotros hallamos, de acuerdo con Leshuk, aumento de la proporción de nicotina con la disminución de fosfatos.

No coincidimos, en cambio, con los datos de este autor acerca del contenido en N. Hallamos un ligero aumento del porcentaje total mientras que él observa disminución del N con la reducción de P en la dieta.

Para el azufre.

Su reducción origina un descenso acentuado del desarrollo de nuestras raíces -de acuerdo con el retardo del crecimiento que parece producir en la planta entera la carencia aguda de S- (Ciferri y Scaramuzzi (44))- ligero descenso de la nicotina y ligerísimo aumento del N total y no alcaloideo y naturalmente, ligero descenso del alcaloideo.

Para el Cl.

Se considera que, aunque los cloruros tienen en general poca importancia para el desarrollo de las plantas, sí la tienen para la de tabaco (Ciferri y Scaramuzzi (44)).

Nosotros observamos que su reducción a $\frac{1}{10}$ de la concentración normal hace aumentar el crecimiento, el cual resulta equivalente al que produce el medio normal si la reducción la llevamos hasta $\frac{1}{50}$.

En cuanto a su influencia sobre el contenido alcaloideo, produce aumento de nicotina. También origina aumento del N en todas sus formas.

de este elemento en plantas completas. Parece ser que el abonado con K favorece el desarrollo (James (4)); nosotros vemos que aumenta el de las raíces cuando reducimos a $\frac{1}{10}$ su concentración y sólo se produce un ligero descenso si la reducción llega hasta $\frac{1}{50}$.

Disminuye en nuestros cultivos el porcentaje de nicotina (el abonado con K hacía bajar el contenido alcaloídeo según James (id.) mientras que el N total aumenta un poco, disminuyendo ligeramente el alcaloídeo y elevándose el no alcaloídeo.

La relación $\frac{N \text{ alcaloídeo}}{N \text{ total}}$ se reduce con el abonado potásico; también se reduce cuando nosotros quitamos ^{ba} potasio.

Es decir, la reducción del K en el medio de cultivo produce efectos contrarios a los que cabría esperar de acuerdo con la acción de los abonos potásicos sobre la planta en cultivo normal.

Ca

Los resultados que obtenemos para el Ca están de acuerdo con los datos que sobre necesidad de K y Ca encontramos: la planta de tabaco parece requerir menos activamente el Ca que el K. (Al reducir el Ca hallamos siempre aumento de peso, aunque la reducción sea hasta $\frac{1}{50}$) En cambio, no lo están con el hecho de que el encañado parece aumenta el crecimiento.

La repercusión sobre alcaloídeos y N sí parece conforme con su efecto sobre la planta entera: encontramos reducción tanto del porcentaje de nicotina como de N total (el encañado hace aumenten ambos) así como de la relación $\frac{\text{nitrógeno alcaloídeo}}{N \text{ total}}$ que aumenta en planta completa con el encañado. Este dato parece de acuerdo con la idea de que entre el K y Ca parece se establece una pugna por el N. El K lo hace desviar hacia proteínas, el Ca hacia alcaloídeos.

Magnesio.

Nuestras raíces no parecen afectadas en su desarrollo por la reducción de este elemento a cuya deficiencia es muy sensible la

hallamos un descenso sensible de alcaloides, nitrógeno total y nitrógeno alcaloideo y aumento del N no alcaloideo. En consecuencia descenso de la relación $\frac{N \text{ nicotínico}}{N \text{ no nicotínico}}$.

Hierro

Nuestros resultados al disminuir el hierro son bastante sorprendentes. Resulta el catión cuya reducción mas afecta al crecimiento. (En la planta de tabaco en el campo rara vez se acusa deficiencia de este elemento que se traduce por clorosis).

Encontramos aumento de alcaloides, cantidad normal de N total y desviación del nitrógeno hacia alcaloideos con elevación de la relación $\frac{\text{nitrógeno nicotínico}}{\text{nitrógeno no nicotínico}}$.

Como hemos visto, no concuerdan en muchas ocasiones nuestros resultados con los conocimientos que se tienen acerca de la influencia de los factores estudiados sobre la planta completa.

Por tratarse en nuestro caso de raíces aisladas es explicable que su respuesta sea distinta. En la misma planta entera, la reacción de los distintos órganos a un agente externo puede ser, como sabemos, totalmente opuesta.

Sería interesante poder contrastar nuestros resultados con los obtenidos en otras experiencias semejantes a las nuestras. Si estudiamos comparativamente los datos que aporta Luna (46) sobre el comportamiento de las raíces de belladona cultivadas "in vitro" ante la deficiencia de elementos nutritivos, con el que nosotros hemos observado para las de tabaco veremos:

Acción sobre el desarrollo

Luna encuentra que la reducción de cualquiera de los aniones o cationes de la solución nutritiva influye siempre en sentido negativo sobre el crecimiento de las raíces de Atropa Belladona. Sobre las de tabaco la reducción moderada de fosfatos, cloruros, calcio y potasio influye favorablemente.

El hierro y sulfatos eran para ella casi indiferentes; para nosotros son el anión y catión que mas disminución producen con una reducción moderada.

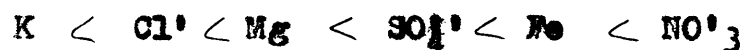
Acción sobre la formación de alcaloides

Sobre el contenido en atropina observa Luna que la reducción de sulfatos y hierro viene a ser indiferente, la de magnesio reduce visiblemente el porcentaje, más aún la de nitratos y potasio y con la de cloruros resulta inapreciable la cantidad de alcaloide. (No da datos acerca de fosfatos y calcio porque dice no obtuvo masa de raíces suficiente para hacer la determinación).

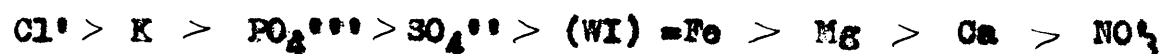
En gran contraste con los resultados expuestos, nosotros hallamos que la reducción de cloruros produce aumento del porcentaje de nicotina y también produce este efecto la del hierro que para belladona era indiferente. En el descenso producido por nitratos, potasio y magnesio, estamos de acuerdo, más no en el orden de intensidad con que actúan estos elementos. Para Luna la intensidad de actuación es de menor a mayor: $Mg < NO_3 < K$; para nosotros es totalmente inversa: $K < NO_3 < Mg$. Los sulfatos, indiferentes para belladona, influyen también poco en el tabaco.

Influencia sobre el contenido en nitrógeno

Para el N total encuentra influencia, siempre negativa, de la reducción de los distintos elementos en el siguiente orden de menor a mayor:

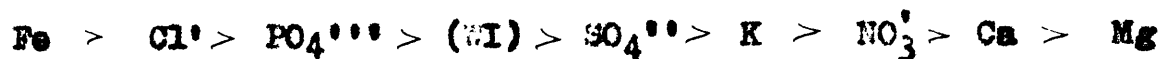


Nosotros hallamos influencia positiva de unos iones, negativa de otros, pudiendo formar la siguiente serie por orden del mayor a menor contenido en nitrógeno influida por ellos:

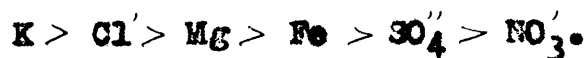


Para el N alcaloideo la serie de influencia de los iones, colocados por orden decreciente de contenido en N de las raíces, es, para

Para las raíces de tabacos:



Para el contenido en nitrógeno no alcaloideo la serie de influencia es, para las raíces de belladona, ordenando según contenido decreciente:



Para las de tabaco:



Nuestros resultados difieren bastante; en algunos casos son totalmente opuestos. La respuesta de las raíces de estas dos plantas alcaloide formadoras ante la deficiencia de elementos nutritivos es muy distinta. No son por tanto las condiciones del cultivo "in vitro" las responsables del comportamiento de las raíces de tabaco. Este comportamiento es específico.

No se nos escapa el hecho de que al hacer variar la concentración de un anión o catión no es éste el único elemento que varía; simultáneamente hemos de modificar también la proporción de los otros cuerpos que con él forman sales.

Esto es inevitable, ya que si tratáramos de compensar su disminución con el aumento o adición de otra sal en la que entren esos elementos siempre introduciríamos una nueva variable.

El inconveniente que esto supone en parte se soslaya, porque, al modificar simultáneamente todas las sales que llevan, por ejemplo, un mismo anión, son varios los metales cuya concentración queda reducida, pero solo en parte, ya que esos metales se encontrarán también acompañando a otros aniones en la solución nutritiva. Será pues mas probable el que el efecto observado se deba al elemento que figuraba repetido en las sales que hicimos disminuir que no a uno de los metales cuya concentración sólo se modificó en una de esas sales.

Sin embargo, hay metales en la solución de White que solo figuran en una sal. Será por tanto conveniente considerar compara-

Por ejemplo, al reducir nitratos quitamos simultáneamente Ca y K . Observamos que el crecimiento disminuye. En la experiencia de cationes, al disminuir la concentración del Ca quitábamos también nitratos; pero de estos quedaban aún bastante cantidad en forma de $\text{NO}_3 \text{ K}$. En este caso el crecimiento aumentaba. La deficiencia del K producía también aumento de crecimiento si era moderada, ligera disminución si era mayor. Luego los efectos de reducción intensa que se tienen cuando quitamos nitratos podemos atribuirlos realmente al anión NO_3^- .

Si consideramos los fosfatos y cloruros vemos que nuestro medio solo los lleva de potasio. Al reducir aquellos reducimos también éste. Pero quedan otras sales potásicas abundantes en ambos casos. Por tanto, el efecto que se observe se deberá al anión y viceversa, cuando sea el K el que queremos hacer disminuir, como de él se encuentran varias sales, estará en mucha menor proporción que en cualquiera de los casos anteriores y podremos con bastante seguridad atribuirle los resultados obtenidos.

Los casos anteriores parecen bastante claros. No ocurre así con los sulfatos. Al disminuir su concentración encontrábamos un acentuado descenso del crecimiento.

Recordando la composición del medio WI vemos, como, al quitar sulfatos quitamos simultáneamente Fe y Mg . Consideremos ahora la experiencia de reducción de cationes y veamos que sales son las que modificamos al reducir estos metales. Tanto para el hierro como para el magnesio solo tenemos una sal: el sulfato correspondiente. Pero mientras al disminuir el Fe descendía mucho el crecimiento, era muy inseguro y poco evidente el efecto producido por la reducción del Mg . Ahora bien; quitamos mucha mas cantidad del ión SO_4^{--} con el Mg que con el hierro, puesto que la cantidad de sulfato férrico que contiene el medio es muy pequeña. Luego el efecto que observamos al reducir sulfatos creo debemos atribuirle, más que a estos, a la falta de hierro o al menos sería la suma de los dos

mentos por la planta de tabaco vicios que es poco exigente en cuanto a aporte de P y S.

La acción favorable que encontramos que produce la reducción de fosfatos está de acuerdo con esto; el efecto negativo acentuado de la de sulfatos no parecía estarlo.

Si, teniendo en cuenta lo expuesto más arriba, consideramos que el efecto aparentemente producido por los sulfatos se debe en realidad a la disminución del Fe que los acompaña, nos explicamos mejor nuestros resultados.

En cuanto a la presión osmótica también variará al reducir las sales pero, igual que para la proporción de los iones, nos encontramos con que si pretendemos compensar esa variación con la adición de otra sustancia siempre se introducirá un nuevo factor distinto.

Es por lo tanto algo inseguro siempre el atribuir determinado efecto a determinada causa, pues cualquier variación en el medio acarreará otras variaciones secundarias; más es preciso aceptar ese encañonamiento de variables. ¿Que condición experimental podría considerarse perfectamente determinada y aislada?

Considerando que de entre todas las sales que componen la solución nutritiva VI, los nitratos eran los más interesantes en relación con la formación de alcaloides, les dedicamos más atención que a los demás elementos disponiendo una experiencia en la que preparamos medios con concentraciones superiores a la normal (2, 5, 10 y 50 veces, a los que nombraremos $+NO_3^1$, $++NO_3^1$, $+++NO_3^1$ y $++++NO_3^1$ respectivamente) para ver su acción no solo por defecto como habíamos hecho para todas las sales, sino también por exceso. Añadimos además un medio con reducción máxima de nitratos ($\frac{1}{10}$ de la normal) al que llamaremos $=NO_3^1$.

Resultados.

Efecto sobre el crecimiento.

Cuadro número 13 y gráfico nº 17.

El aumento de concentración al doble de la normal produjo elevación, tanto del peso en fresco como del seco. El aumento hasta cinco o diez veces la concentración tipo produjo reducción de peso, aunque no muy intensa. La concentración $\times 50$ no era bien tolerada por las raíces que crecieron muy poco.

Con la reducción hasta $\frac{1}{100}$ descendió bastante el peso; pero menos de lo que cabía esperar por los datos que habíamos obtenido para el medio $=NO_3^1$ en la experiencia general de aniones.

Concentración de nitratos y formación de nicotina

Seleccionamos las raíces crecidas en los medios con concentraciones $\frac{1}{100}$, $\times 2$ y $\times 10$ para hacer las determinaciones de nicotina y nitrógeno.

Resultados.

Cuadro número 14 y gráficos nºs 18 y 19.

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE NITRATOS SOBRE EL DESARROLLO

Medios.	Peso fresco en mg	Peso seco en mg
NO_3^-	741,8	69,3
VI	1456,7	120,7
NO_3^-	1620,5	123,8
NO_3^-	1327,9	111,3
NO_3^-	1238,5	113,1
NO_3^-	238,2	24,1

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE NICOTINOS SOBRE EL CONTENIDO EN NICOTINA

Medios	Peso seco reducido en mg	Porcentajes de nicotina en peso					Valores absolutos por cada 100 g en Y			% de nicotina en el líquido do con la total.
		En el polvo.	En el líquido.	Total	Polvo.	Líquido	Total.			
NO ₃	74,5	1,31 (1,49)	1,27 (1,45)	2,58 (2,95)	824	900	1724	49,2 %		
WI	139,9	1,14 (1,30)	1,66 (1,89)	2,8 (3,2)	1345,2	1963	3308,2	59,9 "		
NO ₃	143,4	1,10 (1,25)	2,00 (2,28)	3,1 (3,54)	1332,1	2425	3757,1	64,5 "		
NO ₃	131,1	1,12 (1,27)	2,48 (2,83)	3,6 (4,11)	1238,7	2750	3988,7	68,8 "		

acción extrema no hizo descender mucho la proporción total del alcaloide. Este hecho parece en contradicción con lo que habíamos observado para una reducción menos intensa de los nitratos. (Ver experiencia con sal de aniones)

Al considerar la distribución de la nicotina entre el polvo de la raíz y el líquido de cultivo encontramos que la proporción en el polvo es menor con la mayor concentración de nitratos y que es la curva de nicotina en el líquido la que resulta más significativa para ver la influencia de estas sales.

La relación nicotina en el líquido / nicotina total, como en otros casos que llevamos estudiados, va aumentando con el porcentaje total del alcaloide.

Uno de los pocos casos, de entre todas nuestras experiencias, en los que hemos encontrado mas nicotina en el polvo que en el líquido de cultivo (muy poco más) es en las raíces crecidas en el medio $\frac{1}{3}$, medio que se aleja bastante del óptimo. En los demás casos hay siempre mas del 50, del total en el líquido, y la cantidad contenida en la raíz parece tiende a estabilizarse aunque el total aumenta.

Efecto sobre el contenido en nitrógeno

Las determinaciones de N se hicieron sobre las mismas muestras que las de nicotina, como en todas las experiencias.

Obtenemos los resultados siguientes:

Gráficos nº 15, 16 y gráficos números 18 y 20.

Al observamos el porcentaje total de nitrógeno vemos una clara influencia de la concentración de nitratos cuando su reducción o aumento son considerables. La duplicación de la cantidad normal apenas se hace evidente en un ligero aumento del N total en peso.

No se advierte relación ninguna entre el contenido en nitrógeno y el peso seco.

Nuestros resultados están de acuerdo con los datos suministra-

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE LOS AEROS SOBRE EL COMPORTAMIENTO

Modulo	PESO en kg	Valores absolutos en				Relaciones entre los dife- rentes tipos de nubes				
		N total del polvo	N aeroloides del liquido	N total del polvo	N no aeroloides del polvo	N aeroloides del polvo	N no aeroloides del polvo	N aeroloides del polvo	N no aeroloides del polvo	
103	62,9	1849,5	142,4	255,5	297,9	2004	1707,1	7,69	14,6	17,58
11	110	4770	232,5	339,2	571,7	5109,2	4537,5	4,87	11,1	12,99
103	121,1	4000	230,2	419,1	649,3	5299,1	4649,8	4,72	12,2	13,96
103	116,6	4070	214,1	475,3	609,4	5345,3	4655,9	4,79	11,4	14,30

alcaloides observamos lo siguiente:

El nitrógeno nicotínico varía poco. Hay un pequeño aumento progresivo con el aumento de nitratos pero muy ligero. La curva referente a nitrógeno no nicotínico marcha, en consecuencia, casi paralela a la de N total.

Si estudiamos las relaciones nitrógeno nicotínico / nitrógeno no nicotínico y $\frac{\text{nitrógeno nicotínico}}{\text{N total}}$, observamos que la proporción de N que la raíz desvía hacia la formación de alcaloides es mayor cuanto de menos nitrógeno dispone.

Es interesante el hecho de que en el medio $\equiv \text{NO}_3'$, la cantidad total de nitrógeno asimilada por la raíz fué muy superior al aporte que recibió en forma de nitratos. En los 925 c.c. de solución nutritiva por los que pasó un cultivo en las sucesivas renovaciones del medio nutritivo, había un total de 328 γ de nitrógeno nítrico. en la raíz hallamos un total de 2004 γ acumuló unas 6 veces la cantidad de nitrógeno nítrico que había en el medio.

Lo mismo ocurría para el medio $\equiv \text{NO}_3'$ de la experiencia general de aniones. La cantidad total de nitrógeno existente en la raíz era de 2417,8 γ mientras que el aporte de nitrógeno ^{mineral} ~~universal~~ del medio fué sólo de 5675.

Este hecho nos sorprendió de momento, pero analizado el extracto de levadura que lleva el medio vimos aportaba una cantidad considerable de N: un total de 2257 γ a los 925 c.c. de líquido nutritivo. Este nitrógeno era suficiente para explicar la gran cantidad que encontramos en la raíz crecida en el medio $\equiv \text{NO}_3'$ que debe utilizarle casi en su totalidad cuando no dispone de suficientes nitratos.

Ciferri y Scaramuzzi (11) afirman que en condiciones normales cultivo puede la planta de tabaco utilizar ciertas formas de N orgánico sencillas como urea y asparagina.

Indudablemente también nuestras raíces lo hacen aprovechando al máximo el nitrógeno orgánico de la levadura si no disponen de

La proporción de nicotina resultan de tan gran deficiencia de nitratos. Y el que los cultivos en el medio $\equiv \text{NO}_3^-$ contuvieran más nitrógeno total que los $\equiv \text{NO}_3^-$ pues, en el primer caso, habíamos pasado las raíces en la primera renovación del medio a matraces de litro con 375 c.c. de solución nutritiva en vez de a matraces de 1l. con 250 c.c. de líquido como hemos hecho en casi todas las experiencias. Los cultivos $\equiv \text{NO}_3^-$ dispusieron realmente de más nitrógeno que los $\equiv \text{NO}_3^-$, aunque no nitrógeno nítrico, sino orgánico.

Si comparamos el aporte en nitrógeno y los resultados obtenidos para los cultivos en estos medios con gran reducción de nitratos y los correspondientes valores para los cultivos 3m de la experiencia sobre influencia de las condiciones nutritivas generales, nos encontramos con que estos últimos dispusieron de menos nitrógeno que los primeros (Cuadro nº 17). Sin embargo era muy superior en ellos la cantidad de nitrógeno nítrico.

La proporción del nitrógeno nicotínico con relación al no alcaloideo en las raíces crecidas en los medios $\equiv \text{NO}_3^-$ y $\equiv \text{NO}_3^-$ resulta elevada (17,7 y 17,58% respectivamente) y muy superior a la de los testigos respectivos (12,9 y 12,59 %); para los cultivos en 3m esa proporcionalidad es menor (14,4 %) y casi igual a la de los cultivos 3m'' (14,5 %) equivalentes a los testigos de otras experiencias.

Luego parece deducirse que el nitrógeno orgánico es más adecuado para la formación de nicotina que el nítrico y que la proporción de nitrógeno que la planta desvía hacia la vía alcaloidea depende de la fuente del mismo.

RELACION ENTRE APORES DE N NITRICO Y ORGANICO Y CONSULTIVO EN N DE LAS RAICES

CRECIDA EN VARIOS MEDIOS.

Medios.	Nitrógeno de que dispuso la raíz en la solución nutritiva. (En gmmms)		Nitrógeno presente en la raíz.	
	Nitrógeno.	Procedente del extracto de levadura.	Total	Porcentaje total.
HNO_3	567,5	1952	2519	2,43
HNO_3	28376	1952	30328	4,01
HNO_3	328	2257	2585	3,01
HNO_3	32809	2257	35066	4,08
HNO_3	1773,5	122	1895,5	2,38
HNO_3	28376	1952	30328	4,12
				14,5

En los análisis de plantas de tabaco se observa que la proporción de alcaloides asciende cuando es más baja la de glúcidos. Así ocurre cuando la planta ha permanecido en la oscuridad o al final de su ciclo vital, después que se consumieren gran cantidad de hidratos de carbono en la floración y fructificación.

Se trata solamente de un efecto secundario, consecuencia de la disminución de masa total que se produce al agotarse los carbohidratos. Si los alcaloides permanecieron inalterados aumentarían proporcionalmente.

que permanecen inalterados aún con agotamiento de glúcidos lo observa Mothes (53) para hojas de tabaco unidas a la planta, mientras por otra parte Dawson (49) establece que un aumento artificial de aquellos hace que en la planta que consumió los propios se restablezca la proporción normal de nicotina.

Ciferri (10) admite que la exaltación del metabolismo y correlativamente, el aumento de los productos resultantes de la fotosíntesis hacen aumentar la cantidad total de nicotina. Como se produce aumento general de masa, Ciferri deduce que la nicotina debe tener importancia como elemento integrante de la masa total de sustancias nitrogenadas que equilibrarían a la de glúcidos en la planta.

En otra experiencia, el propio Ciferri ^{con} y Pratesi (·) al estudiar la acción del ácido nicotínico y derivados, observaron que había disminución de nicotina cuando sumergían tallos foliados de tabaco en una solución nutritiva sin sales nitrogenadas y con sacarosa. Como se mantenía el nivel de N total así como de alcaloides secundarios, interpretan estos resultados admitiendo que la planta, en presencia de azúcar y falta de N mineral (disponía del N del ácido nicotínico) trataba de compensar el desequilibrio producido en la relación carbohidratos /albuminoides separando parte de N alcalo-

no nicotínico a albuminoides si según el mismo Ciferri los alcaloides sirven para equilibrar los glúcidos.

Deseario ver el efecto directo que produciría la proporción de azúcar de que dispusiera la raíz realizamos la presente experiencia.

Preparamos medios con una amplia gama de concentraciones de sacarosa: 0,2 - 0,5 - 1 - 2 - 5 - 10 - (20) - 30 - 40 - 50 - 75 - 100 - 125 - 150 y 200 gramos por litro.

Por comprender tantas variantes dividimos este ensayo en dos: uno para los valores inferiores a la concentración normal de sacarosa en el medio WI (20 gr./l.); otro para los superiores a él.

Efecto sobre el desarrollo

Resultados: Cuadro nº 18

y gráficos números 21

Las concentraciones mínima y máxima soportadas por la raíz fueron 2 y 150 gr. por litro. Por debajo o por encima de esas concentraciones limite las raíces morían (Hildebrandt y colaboradores (39) encuentran para tejidos de tabaco cultivados "in vitro" 1,25 y 160 g. por litro de azúcar como valores extremos).

El óptimo lo obtuvimos para los 40 gr./l. que dieron el mayor peso en seco (Hildebrandt (40) encuentra que ese óptimo para los tejidos de tabaco son los 10 gr./l. siendo bastante favorables todas las concentraciones comprendidas entre 5 y 10 gr./l.). Comparando los valores para pesos en seco y en fresco se observa un aumento en la relación peso seco/ peso fresco con el aumento de la concentración del azúcar. (Esto no es válido para los 2 gr./l.; pero este dato no concuerda ^{con los demás} por ser el desarrollo en este medio reducidísimo y en estos casos siempre hay menor diferencia entre los pesos secos y frescos como consecuencia de no retener agua externa según ya se dijo. A pesar de la reserva con que debemos tomar los

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SACAROSA SOBRE EL DESARROLLO

Concentraciones	Peso medio en fresco en mg.	Peso medio en seco, en mg.
0,2 gr./l.	—	—
0,5 "	—	—
1 "	Iniciación del crecimiento en la (1)	—
2 "	19,9	4,7
5 "	688,8	45,3
10 "	1136,8	87,1
20 " (WI)	1501	115,4
30 "	1360,2	129,8
40 "	1367,1	159,6
50 "	1302,5	142,4
75 "	982	118,8
100 "	617,5	83,6
125 "	Sin datos.	5,8
150 "	Sin datos.	4,3
200 "	—	—

(1) gitud de una sola raíz.

la concentración del medio estándar, los 40 gr. por litro, resultó ser el que las raíces presentaban el aspecto mas lozano. Aparentemente era éste el medio óptimo, pero el peso en seco nos dijo no era así.

El aumento del peso seco con relación al fresco nos parece lógico: la abundancia de sacarosa favorecería la formación de elementos mecánicos; la mayor presión osmótica del medio haría que la raíz tomara menos agua.

Efecto sobre la formación de nicotina.

Para las determinaciones de nicotina y nitrógeno seleccionamos las raíces crecidas en las soluciones con concentraciones bajas o elevadas tales, que produciendo efectos visibles sobre el crecimiento permitieron un desarrollo suficiente para obtener cierta masa de raíces. Escogimos las de los medios con 5, (20), 50 y 100 gr. por litro.

Resultados:

Cuadro nº 19 y gráficos nº 22 y 23.

La concentración de sacarosa ejerce gran influencia sobre la formación de nicotina.

El porcentaje total del alcaloide va aumentando con la proporción de sacarosa.

Ese aumento no guarda relación con el desarrollo, pues mientras el óptimo para peso seco se obtuvo para los 40 gr., la cantidad de nicotina aumentó gradualmente de los 5 a los 100 gr. de azúcar por litro.

El valor obtenido para la última concentración es el máximo valor absoluto de porcentaje total que hemos hallado en todas las experiencias. (Reducidos los valores a la cifra media para los testigos (3,2%) resultaba algo mayor el que obtuvimos al adicionar 10 mg. por litro de ácido nicotínico).

Aunque la curva de porcentaje total asciende desde 5 a 100 gr. se observa una ligera inflexión que coincide con el máximo crecimiento

MEMORIA DE LA CONCENTRACION DE NICOTINA EN LA FORMACION DE NICOTINA

Concentraciones de nicotina en g./l.	Peso seco reducido en mg.	Porcentajes de nicotina en peso.						Valores absolutos en %			% de nicotina en el líquido con relación a la total.
		En el polvo.		En el líquido.		Total.		Polvo.	Líquido.	Total	
		Valor hallado.	Reducido.	Hallado.	Reducido.	Hallado.	Reducido.				
5 g./l.	(81,2)	1,21	(0,94)	1,44	(1,20)	2,65	(2,16)	963	1150,6	2113,7	54,33 (55,9)
5 g./l. para 5 g. de nicotina.	(139,9)	1,55	(1,20)	2,37	(1,99)	3,92	(3,2)	2125	3357,5	5482,5	60,45 (62,24)
50 g./l. para 50 g. de nicotina.	(139,9)	1,19	(1,20)	2,12	(1,99)	3,31	(3,2)	1861	3320	5181	64,04 (62,24)
50 g./l.	(172,6)	1,41	(1,43)	3,1	(2,91)	4,51	(4,36)	2721,3	6000	8721,3	68,78 (66,8)
100 g./l.	(125,3)	1,43	(1,44)	3,87	(3,61)	5,3	(5,1)	2003,4	5421,9	7425,3	73 (70,9)

dad de nicotina que se encuentra en el líquido de cultivo que la existente en el polvo de las raíces y cómo se hace más evidente la acción de los hidratos de carbono si consideramos la totalidad de nicotina (en el polvo y en el líquido) que si nos limitamos a la del polvo. En este parece que si al principio oscila la proporción del alcaloide después tiende a estabilizarse.

Si tenemos en cuenta la relación alcaloide en el líquido de cultivo / alcaloide total, vemos como va aumentando con el porcentaje total de nicotina.

Efecto sobre el contenido en nitrógeno

Resultados:

Cuadros números 20 y 21 y

gráficos números 22 y 24.

El porcentaje de N total contenido en el polvo varía poco (un 7 % de diferencia entre el testigo y el medio con 5 gr. / l. que es donde es más acusada) y existe una cierta proporcionalidad inversa con respecto al crecimiento. Lo mismo ocurre si consideramos el nitrógeno total. El nitrógeno no alcaloideo va disminuyendo con el aumento de azúcar. De aquí que la relación nitrógeno alcaloideo / no alcaloideo se eleve considerablemente de manera progresiva. Lo mismo ocurre para la relación nitrógeno alcaloideo / total y encontramos lo mismo si consideramos las relaciones entre el nitrógeno nicotínico o el total sólo en el polvo.

En resumen, parece que el azúcar fuerza al nitrógeno a tomar la vía alcaloides. Esto parece contrario a la reducción de alcaloides observada por Ciferri y Pratoni (.) cuando proporcionaban a los tallos azúcar y los privaban de nitrógeno. Claro que en nuestro caso no falta este elemento, pero esto no explica el que al aumentar el azúcar disminuya el nitrógeno no alcaloideo. Más parece como si, en efecto, contaran los alcaloides en el total de sustancias nitrogenadas.

Ref. de Ciferri (10)

INFLUENCIA DE LA COMESTIBILIDAD DEL SACATONA SOBRE EL CEMENTO EN EL
POBOL MIBS EN LA Z. SECO

Concentración de sacatona en mg.	Peso seco reducido en mg.	N total del polvo.		N alcoholizado del polvo.		N alcoholizado total		N total por cultivo.		N no alcoholizado	
		1/2 Ha-llado.	Redu-cido.	1/2 Ha-llado.	Redu-cido.	1/2 Ha-llado.	Redu-cido.	1/2 Ha-llado.	Redu-cido.	1/2 Ha-llado.	Redu-cido.
5 gr/l.	(81,2)	4,27	(4,09)	0,21	(0,17)	0,45	(0,40)	4,51	(4,30)	4,06	(3,90)
20 gr/l. (total para 5 gr)	(139,9)	3,99	(3,82)	0,26	(0,22)	0,68	(0,59)	4,41	(4,19)	3,72	(3,59)
20 gr/l. (total para 5 gr)	(139,9)	4,00	(3,82)	0,20	(0,22)	0,57	(0,59)	4,36	(4,19)	3,79	(3,59)
50 gr/l.	(172,6)	3,86	(3,69)	0,24	(0,25)	0,78	(0,85)	4,39	(4,23)	3,61	(3,48)
100 gr/l.	(125,3)	3,97	(3,79)	0,24	(0,26)	0,91	(0,96)	4,63	(4,45)	3,72	(3,49)

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE LA MARCHOSA SOBRE EL CONTENIDO EN N

Concen- tracio- nes de marchosa en gr./ l.	Peso seco real en mg.	Valores absolutos en Y					Relaciones entre las distintas clases de nitrógeno.			
		Total del polvo.	Alcoholado.			Nitró- geno total.	N no alcohol- ado.	% de N alcoh- olado a N total en el polvo. Hall. Red.	% de N alcoh- olado con relación a total Hall. Red.	% de N alcoh- olado con relación a no alcohol- ado. Hall. Red.
			en el polvo.	en el 1° quido.	Total.					
5	79,6	3398,9	166,4	198,8	365,2	3597,7	3232,5	4,89 (4,35)	10,1 (9,3)	11,29 (10,26)
20 (18,41%)	137,1	5470,3	361,1	580,3	941,1	6050,6	5109,2	6,6 (5,87)	15,5 (14,3)	18,42 (16,74)
20 total por 100	156,4	6256	321,6	572,6	894,2	6828,6	5934,4	5,14 (5,87)	13,1 (14,3)	15,06 (16,74)
50	193	7442,8	470,3	1037	1507,3	8486,8	6979,5	6,31 (7,20)	17,7 (19,3)	21,59 (23,99)
100	140,1	5562	346,2	937,1	1283,3	6493,1	5215,6	6,22 (7,10)	19,7 (21,5)	24,60 (27,34)

no forma los mismos alcoholoides con hombre de glúcidos. (Claro que aquí es "forma" no "rotione" como en las hojas de *iothes*).

El estudio de los efectos de la variación del p H sobre plantas completas en cultivos hidropónicos presenta bastantes dificultades, que se encuentran aumentadas si se trata del cultivo de raíces aisladas.

El primer inconveniente con que se tropieza es con que los p H altos hacen precipitar ciertas sales, principalmente los fosfatos, que pueden así bloquear elementos indispensables para la planta. Por el contrario, una acidez elevada puede también originar perturbaciones en la composición del medio al solubilizar las vasijas de cultivo.

Además, es difícil mantener constante un p H determinado en la solución de cultivo. El metabolismo de las raíces pronto le hace variar.

Para evitar lo primero Arnon, Fratzke y Johnson (•) preparan una solución nutritiva provisional y la llovan al p H mas alto que quieren estudiar, con lo cual precipitan parte de las sales. Filtran y analizan la composición del líquido filtrado para ver la cantidad que conserva en disolución de los distintos elementos.

Preparan entonces la solución definitiva con la concentración que de cada elemento resultó soluble al p H más alto. (Las sales que tuvieron que reducir mas fueron los fosfatos.)

Otro problema en estos ensayos es la adición del hierro que en solución alcalina es insoluble. Lo resuelven añadiéndolo en forma de humato, sal esta que permanece disuelta entre los p H 3 a 9.

Sobre la solución así preparada ajustan los distintos p H con H_2SO_4 o Na OH.

La variación de la reacción del medio con la presencia de la planta tratan de neutralizarla mediante las siguientes precauciones.

1ª).- Emplean grandes cantidades de solución nutritiva en re-
Ref. de Borbolla y Camoyán (6).

Esta manera se renueva el líquido en contacto con las raíces y los cambios producidos por su metabolismo se diluyen en su totalidad resultando así cuantitativamente poco pronunciados.

3a).- Renuevan muy frecuentemente la solución.

4a).- Dejan caer gota a gota NaOH o SO_4H_2 N / 10 ó N / 100 sobre el líquido de cultivo.

A pesar de todas estas precauciones no pueden evitar el que al final de la experiencia haya variado ligeramente el pH, especialmente en los medios mas alcalinos.

Adeptamos para nuestra experiencia el medio de Arnon y colaboradores citados (previamente habíamos intentado utilizar el WI pero precipitaba mucho en las variantes alcalinas y ademas el p H viraba siempre hacia 5,5 que es el normal de este medio) que diluímos cinco veces para que tenga una concentración molar parecida a la del WI (No disminuimos los fosfatos ya muy reducidos).

Adicionamos Cl K (nuestro medio "standard" lleva Cl) y el azúcar y extracto de levadura necesarios para las raíces.

Preparamos el humate de hierro siguiendo a Horner, Burk y Hoover (40)

Ajustamos los pH con SO_4H_2 y KOH en vez de NaOH por no introducir Na, elemento extraño a nuestros cultivos.

Preparamos una serie de variantes que comprendían p H de 4-9.

Esterilizamos en autoclave y comprobamos la reacción de cada medio después de esterilizado. Había habido precipitación de las sales en los alcalinos y variación del pH en todos.

p H original

p H después de esterilizados.

4	_____	4,5
5	_____	5,5
6	_____	6
7	_____	6,5
8	_____	7
9	_____	7,5

Probamos a esterilizar por filtración. Se producían las mismas

hasta que se esterilizaban. Más como filtrando evitábamos la precipitación adoptamos esta forma de esterilización.

Al hacer la siembra dejamos sin sembrar un matracito de cada variante que colocábamos junto a los cultivos como testigos.

Renovábamos la solución nutritiva semanalmente (las otras precauciones que adoptaban Arnon y colaboradores (*op.cit*) presentan especiales dificultades para los cultivos "in vitro").

A cada renovación comprobábamos el p H de los líquidos metabolizados y el de los matraces que dejamos sin sembrar. No variaban; acaso descendían ligeramente el de los medios con p H : 6 que contruó raíces. Podíamos confiar en que los resultados que obtuviéramos se deberían realmente a los diferentes p H.

Los líquidos gastados se guardaron, como de costumbre, al final de cada renovación.

A los dos meses recogimos las raíces.

Los resultados que obtuvimos fueron los siguientes:

Efecto sobre el crecimiento

Cuadro nº 22 y gráfico nº 25 A.

Viendo en dos repeticiones de la experiencia que los cultivos solo crecían en proporción apreciable con los p H efectivos 5,5 - 6 y 6,5, preparamos matraces abundantes limitados a estos tres, a fin de poder obtener alguna masa de raíces sobre la que poder hacer las determinaciones de nicotina y nitrógeno.

Solo conseguimos cantidad suficiente para investigar nicotina; para el nitrógeno fué imposible reunir el polvo necesario de las raíces crecidas en los medios con otro p H que no fuera 5,5.

Efecto sobre la formación de nicotina

Se investigó sobre las variantes 5,5 y 6,5

Cuadro nº 23 y gráfico nº 25 B y C.

INFLUENCIA DEL P H SOBRE EL DESARROLLO

p H Indolus.	p H efectivos.	Pesos en fresco en mg.	Pesos en seco en mg.
4	4,5	0,21	0,17
5	5,5	149,5	12,9
6	6 (bajo)	29,5	2,24
7	6,5	14,9	1,5
8	7	7,8	0,8
9	7,5	5,8	0,54

INFLUENCIA DEL PH SOBRE LA RELACION DE NICOTINA

pH efectivos	Peso seco redu- cido en mg.	Porcentajes de nicotina en peso seco.						Valores absolutos en g			% de ni- cotina en el lí- quido en relación a nico- tina to- tal.
		En el polvo.		En el líquido		Total	Polvo.	Líquido.	Total		
		% Ni- lado.	Redu- cido.	% Ni- lado	Redu- cido						
5,5	(139,9)	0,77	11,03	1,61	(2,16)	2,38	(3,2)	28,18	54,9	81,08	67,6
6,5	(16,2)	0,74	(0,99)	2,26	(3,03)	3,--	(4,03)	14,65	44,8	59,45	75,3

Las raíces se muestran muy sensibles al p H del medio. Prácticamente no se desarrollan fuera de los p H 5,5 - 6,5 siendo muy pequeño el crecimiento para 6 y 6,5. Con 7 y 7,5 comienzan a crecer algo en longitud y el p H : 4,5 es totalmente inadecuado.

Se muestran mas exigentes, pero este factor, las raíces que la planta completa. El tabaco según Ciferri y Scaramuzzi (11) donde mejor prospera es en el suelo con un p H de 5,5 - 6,5 pero vive bien en los que hay de 6,5-7,5 y tolera los comprendidos entre 4,5 y 5,5.

Aunque nuestras raíces sean más exigentes -natural encontrándose en situación tan anormal como es el vivir aisladas del brote- coinciden los p H que toleran con los óptimos para planta completa. También coinciden bastante nuestros resultados con los que Hildebrandt y col. (39) hallan para los tejidos de tabaco cultivados "in vitro": de 5 a 5,4 (Realmente nuestro p H : 5,5 era siempre un poco bajo).

El contenido de nicotina se ve también afectado por la reacción del medio.

Coinciden nuestros resultados en este sentido con lo hallado corrientemente en la literatura: mas nicotina proporcionalmente p H mas alto (Mc Nair (·); Ozerov (·); James (·)) aún cuando Stillinge y Laurie (·) difieran de esta opinión general.

La proporción del alcaloide que encontremos en el líquido es elevada, muy superior a la que hay en las propias raíces. Esa proporción es más alta para el p. H : 6,5, donde hay más nicotina total, que para 5,5.

(·) Citados de James en "The Alk." (1).

amoniaco.

Para ver comparativamente la acción de nitratos y sales amónicas sobre nuestras raíces, utilizamos las soluciones nutritivas de Arnon (2) diluidas hasta $\frac{1}{4}$ de la concentración original para hacerlas equivalentes en concentración molar al medio WI.

Añadimos el X sacarosa y extracto de levadura en la proporción en que van en el WI.

Ajustamos con H_2SO_4 y KOH los p H: 4,5 - 5,5 - 6,5 y 7,5 en cada medio para una experiencia de tanteo.

Los resultados sobre el crecimiento -en peso seco solamente- fueron los siguientes:

p H		Medio con sales amónicas.	Medio con nitratos.
Iniciales.	Efectivos		
4,5	(4,5)	Ningún desarrollo	Ningún desarrollo
5,5	(5,5)	1,1 mg	148,5 mg
6,5	(6)	9,3 "	1,2 "
7,5	(6,5)	0,3 " (Iniciación del crecimiento en longitud)	0,36 " (Iniciación del crecimiento en longitud)

Visto el p H más conveniente en cada caso (que como es lógico era más alto para el medio con sales amónicas) tratamos de ver si el escaso crecimiento que se producía en este medio podría ser debido a que no fuera la utilizada la concentración más conveniente.

Preparamos entonces la solución con sales amónicas a concentraciones doble, mitad $\frac{2}{5}$ y $\frac{1}{10}$ de la que habíamos puesto pri-

Concentraciones del medio
con sales amónicas.

Peso seco en mg.

2	_____	Ningún desarrollo.
1	_____	8 mg
$\frac{1}{2}$	_____	5,5 "
$\frac{1}{5}$	_____	6 "
$\frac{1}{10}$	_____	3 "

Por tanto, si bien poco adecuado siempre el medio con sales amónicas, a la concentración que habíamos ensayado primitivamente y el p H : 6,5 (6) era como resultaba más conveniente.

Y en solución con estas condiciones preparamos cultivos abundantes-(80)-para ver si podíamos obtener alguna cantidad apreciable de raíces. Del medio con nitratos preparamos sólo 20 cultivos con p H = 5,5.

Resultados

Los pocos medios de estos últimos cultivos, que fueron los que utilizamos para determinar nicotina y nitrógeno son:

Medio con sales amónicas. _____ 6,38 mg.

" " nitratos. _____ 34,91 "

(Gráfico nº 26 A)

Efecto sobre la formación de nicotina

Cuadro nº 24 y gráfico nº 26 B y C.

En los dos medios el porcentaje total de nicotina fué bajo, pero mucho menor en el caso de las sales amónicas (si consideramos los valores reducidos al del WI, asimilando los del medio con nitratos a los testigos de otras experiencias, se ve bien el efecto negativo del nitrógeno amónico).

Esta es una de los pocos casos en los que hemos encontrado menor proporción de alcaloide en el líquido de cultivo que en las raíces y como siempre que ha ocurrido esto el porcentaje total era

INFLUENCIA DEL NITRÓGENO O AMONIO SOBRE LA FORMACIÓN DE NICOTINA

Modos	Peso en mg.	PORCENTAJES DE NICOTINA EN PESO						Valores absolutos en				de n. coquina el líquido de con n. nicotina total.
		En el polvo	En el líquido	Total	Polvo.	Líquido	Total					
Jales amóniacos	6,38	0,39	(0,73)	0,35	(0,66)	0,74	(1,39)	24,8	22,5	47	47,3	
Nitrato	34,91	0,99	(1,87)	0,71	(1,33)	1,7	(3,2)	345,6	247	592,6	41,7	

Efecto sobre el contenido en nitrógeno

Cuadros números 25 y 26 y gráficos nº 26 D y E

El porcentaje de N total resulta algo más bajo para sales amónicas (para nitratos viene a ser como en los cultivos en WI). El de N alcaloideo es mucho menor para sales amónicas que para nitratos, resultando el valor más pequeño que hemos encontrado en todas las experiencias. El no alcaloideo es ligeramente menor para sales amónicas que para nitratos.

Las relaciones nitrógeno alcaloideo a no alcaloideo o a total (considerando bien sea solo los relativos a polvo de raíces o los totales) son mucho menores para sales amónicas que para nitratos.

Podemos resumir nuestros resultados en los puntos siguientes:

1ª).- Las sales amónicas son poco adecuadas para el cultivo "in vitro" de raíces de tabaco.

2ª).- El porcentaje total de N se ve poco afectado por las sales amónicas. Es algo inferior al de las raíces crecidas en medios con nitratos ya sea el de Armon o el WI.

3ª).- El porcentaje de nicotina es muy bajo para sales amónicas.

4ª).- La relación $\frac{\text{nitrógeno nicotínico}}{\text{nitrógeno no nicotínico}}$ es mucho menor para sales amónicas que para nitratos. // En consecuencia: los nitrógenos nítrico y amoniacal no son equivalentes para las raíces de tabaco cultivadas "in vitro".

Se comportan nuestras raíces de manera muy diferente a como lo hace la planta normal. Según Ciferri y Scaramuzzi (44) esta puede utilizar lo mismo cualquiera de las dos formas de nitrógeno mineral; nuestras raíces no. Además, a pesar de que Vickery y colaboradores (66) observan que los tejidos de tabaco pueden acumular cantidades considerables de nitrógeno amónico sin mostrar síntomas de intoxicación, para nuestras raíces parece que las sales amónicas

INFLUENCIA DEL N NITRICO O AMONICO SOBRE EL CONTENIDO EN NITROGENO

POPCINOS/JLS EN PR.30

Medios.	Peso seco en mg.	N total del polvo.		N alcohólico del polvo.		Nitrógeno alcohólico total.		N total por cultivo.		N no alcohólico.	
		% Hielo.	Hielo.	% Hielo.	Hielo.	% Hielo.	Hielo.	% Hielo.	Hielo.	% Hielo.	Hielo.
3000 en solución	6,38	3,41	(3,29)	0,06	(0,06)	0,11	(0,10)	3,47	(3,33)	3,34	(3,23)
1 litro	34,91	3,95	(3,82)	0,17	(0,16)	0,29	(0,28)	4,07	(3,93)	3,77	(3,64)

INDUSTRIA DEL FENÓGENO EN EL MUNICIPIO DE SAN JUAN DE LOS RIOS

Productos	Peso en kg	Valores absolutos en Y						Relaciones entre las dife- rentes clases de F.		
		N total del polvo.	Alcoholados.			N total por cultivo.	N no alcohol- ado.	% del F alcohol- ado con relación al total en ve.	% de F alcohol- ado con relación al total.	% de F alcohol- ado con relación al total.
			Pol polvo.	Del líquido	Total.					
Fenógeno	6,38	217,5	4,28	3,88	8,16	221,38	203,22	1,96	3,6	3,8
Alcoholados	34,91	1379,8	59,7	42,69	102,39	1421,59	1319,2	4,32	7,2	7,7

to anteriormente, en otros casos de deficiencia de nitrógeno mineral. El escaso crecimiento en el medio con sales amónicas no puede deberse entonces a carencia de N.

También los efectos que observamos sobre formación de nicotina y contenido en nitrógeno son diferentes a los hallados en la literatura: en nuestro caso hay menos nicotina con sales amónicas que con nitratos en contra de los datos que vemos para plantas alcaloide- formadoras en general. (Mc Nair (.); Cronwell (-); James (.) o para tabaco en particular Dawson (14)). Unicamente coinciden con los nuestros los resultados que obtiene Jerrano (62) para plántulas de tabaco, haciendo germinar las semillas en agua o en soluciones de nitratos o de sales amónicas. Halla un aumento mayor del porcentaje de nicotina para nitratos que para sales amónicas.

El p H óptimo distinto para los medios con nitratos o sales amónicas, si responde a la idea de que la planta tome mejor el nitrógeno nítrico en medio más ácido, el amónico en el menos ácido, porque la absorción tenga lugar por combinación con las proteínas de los pelos absorbentes disociadas como ácido o base según la reacción del medio ambiente.

(.) Citados de James en "The Alk." (1).

ácido nicotínico.

Considerados prolina y ácido nicotínico las sustancias más interesantes como probables precursores de la nicotina, hemos querido ver su influencia directa sobre el órgano formador del alcaloide.

Hemos desdoblado la experiencia en dos:

- a) Acción independiente de prolina, oxiprolina y ácido nicotínico.
- b) Acción conjunta de ácido nicotínico y prolina.

Ensayamos para cada una de estas sustancias las proporciones: 2, 10 y 50 mg./l., que adicionamos al medio WI.

Resultados

Efecto sobre el crecimiento

Cuadro nº 27 y gráfico nº 27

El ácido nicotínico a la concentración de 2 mg / l se muestra indiferente; a la de 10 mg / l los resultados son dudosos, pues en unas siembras favorece ligeramente el aumento de peso, en otras lo reduce y aún en alguna resultó inhibitor. Como valor medio de las siembras sucesivas obtenemos un ligero efecto perjudicial. Los 50 mg/l inhiben siempre. En ningún caso se observa la acción de sustancia de crecimiento que se atribuye a este compuesto. Por tanto, los efectos que podemos observar sobre el contenido de nicotina son específicos de esta sustancia y no consecuencia de una actuación del metabolismo, interpretación que se ha dado generalmente a su influencia.

La prolina, a las concentraciones de 2 y 10 mg / l, resulta indiferente. Los 50 mg. permiten un crecimiento bastante considerable, aunque reducido con relación al medio normal.

La oxiprolina resultó en todos los casos perjudicial. Con 2 mg / l hubo una reducción marcada del peso y los 10 y 50 mg eran inhibidores. (Acaso esta discrepancia con el comportamiento de la prolina fuera debida a la distinta procedencia de las dos sustancias, que pudiera ser causa de un diferente grado de pureza).

Efecto sobre la formación de nicotina

Determinamos nicotina y nitrógeno en las raíces crecidas en los medios con 2 mg / l de la sustancia a ensayar, por ser esta concentración la única que nos dió masa suficiente con los tres compuestos.

SOENA EL DESARROLLO

Medios	Pesos en fresco en mg.	Pesos en seco en mg.
Ac. nicotínico 2 mg./l	853,6	116,9
Ac. Nicotínico 10 mg./ l	1060,4	104,6
Ac. nicotínico 50 mg./l.	—	—
Prolina 2 mg/l.	1258,2	110,5
Prolina 10 mg./l.	1344,8	110,7
Prolina 50 mg./l.	1135,8	89,1
Oxiprolina 2 gr/l.	882,7	85,1
Oxiprolina 10 mg/l	—	—
Oxiprolina 50 mg./l.	—	—
WI	1111,5	116,1

ácido nicotínico y la oxiprolina se comportan bastante anormalmente y en todo caso se observa un ligero efecto negativo. La prolina nos da bastante menos nicotina que la que hallamos en las raíces crecidas en el medio testigo.

Si observamos la distribución del alcaloide entre las raíces y el líquido de cultivo, vemos cómo es aquí donde se encuentra la mayor parte (más del 50%) en todas las variantes, viniendo a ser la curva que exprese su relación muy parecida a la de porcentaje total. A grandes rasgos sigue la norma de elevarse paralela ante a la proporción de nicotina total; únicamente no está de acuerdo con esto en el medio con prolina si comparamos los resultados con los que dan las otras sustancias; si lo está si sólo los comparamos con los del testigo.

Hay en todos los casos algo más de alcaloide proporcionalmente en el polvo de los cultivos experiencia que en los del medio WI, siendo el ácido nicotínico el que parece que hace retener más cantidad a la raíz.

Efecto sobre el contenido en nitrógeno

Cuadro nº 29 y gráficos nºs 28 y 30.

La cantidad total de nitrógeno varía poco de unos medios a otros, (hay un ligero aumento con oxiprolina) y su curva es casi inversamente proporcional a la de pesos.

La relación nitrógeno alcaloides / nitrógeno no alcaloides es poco significativa pero en definitiva nos indica que la acción del ácido nicotínico, prolina y oxiprolina, a la concentración de 2 mg / l, es, no solo poco o nada efectiva para la formación de nicotina, sino que la presencia de estas sustancias hace desviarse más nitrógeno hacia albuminoides que el que va en esa dirección en los cultivos testigo.

EXPERIENCIA DE LA PRESENCIA DE ACIDO NICOTINICO, PROTEINA U OXIPROTEINA
SOBRE LA FORMACION DE NICOTINA

Muestras.	Peso seco reducido en mg.	Porcentajes de nicotina en peso						Valores absolutos en			% de nicotina en el líquido con relación a la nicotina total.
		En el polvo.	En el líquido.	Total.		Polvo.	Líquido.	Total.			
Ac. níctico	(139)	1,44	(1,26)	1,97	(1,73)	3,41	(3)	2118	2906	5024	57,7
Protina	(136)	1,02	(0,89)	1,73	(1,52)	2,75	(2,42)	1467,8	2502,5	3970,3	62,9
Oxi protina	(106,4)	1,18	(1,03)	2,33	(2,04)	3,53	(3,1)	1328,7	2630,6	3959,3	66
VI	(139,9)	1	(0,87)	2,64	(2,32)	3,64	(3,2)	1488	3918,7	5406,7	72,5

DETERMINACION DE LA PRESENCIA DEL ACIDO NICOTINICO, PROLINA U OXIPROLINA SOBRE EL

CONTENIDO EN N

FORCENTAJES EN PESO SECO.

Modulos.	Peso seco en mg.	N total del polvo.		N alcaloides del polvo.		N alcaloides total		N total per cultivo.		N no alcaloi- des.	
		Re- ducido.	Redu- cido.	% li- llado	Redu- cido	% li- llado	Redu- cido	% li- llado	Redu- cido	% li- llado	Redu- cido.
Ac. nig tánico.	(139)	3,72	(3,83)	0,24	(0,247)	0,99	(0,609)	4,05	(4,18)	3,46	(3,57)
Prolina	(136)	3,81	(3,93)	0,17	(0,175)	0,47	(0,48)	4,10	(4,23)	3,63	(3,75)
Oxipro- lina	(106,4)	4,01	(4,14)	0,20	(0,206)	0,60	(0,61)	4,40	(4,54)	3,81	(3,93)
NI	(139,9)	3,7	(3,82)	0,17	(0,175)	0,63	(0,68)	4,15	(4,29)	3,52	(3,64)

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE ACIDO NICOTINICO, PROTEINA U OXIPROTEINA SOBRE

EL CONSUMIDO EN N

Resoluciones entre las distintas clases de N.

Modios	Peso en MG.	N alcohólico.		N total		N no al		del	
		de tel	del	de tel	del	de tel	del	de tel	del
147,1	5460	366	502,2	868,2	5962,2	6,7	15,3	17,04	
143,9	5480	253,6	432,5	686,1	5912,5	226,4	4,62	11,6	12,1
112,6	4510	229,6	454,6	684,2	4964,6	290,4	5,09	13,7	15,7
148	5476	257,18	677,3	934,4	53,3	218,8	4,67	15,1	17,9

y prolina.

Puesto que se discute cual de las dos sustancias -ácido nicotínico o prolina- sea más eficaz para la formación de nicotina, pensemos si proporcionando a las raíces ambas simultáneamente se elevaría la proporción del alcaloide, ya que tendrían a su disposición los dos núcleos del mismo y no habría el problema del paso del anillo de la prolina al de la piridina.

Como en la experiencia anterior se había visto que los 2mg/. de cualquiera de las sustancias ensayadas era poco eficaz y, por otra parte, la de 50 mg de ácido nicotínico no permitía el crecimiento de las raíces, escogimos la de 10 mg como base para esta nueva experiencia, estableciendo las siguientes variantes:

10 mg/l de ácido nicotínico.

10 " " prolina.

5 mg/l de ac. nicotínico más 5 mg/l de prolina.

10 " " " " más 10 " " "

Resultados.

Efecto sobre el crecimiento

(Ver cuadros números 31 y 33 referentes a nicotina y nitrógeno)
Como vemos, resultan bastante indiferentes todos los medios comparados con el WI, excepto el que lleva 10 mg. de ácido nicotínico, que en esta experiencia dió un peso algo más elevado que el de los cultivos testigo.

Efecto sobre la formación de nicotina

Cuadro número 31 y gráficos nºs 31 y 32.

En todas las variantes hubo aumento del porcentaje total sobre el del testigo.

Con los 10 mg / l de ácido nicotínico obtuvimos el máximo va-

INFORME DE LA EXPERIENCIA EXPERIMENTAL DEL AGENTE NICOTINICO Y PROLINA

ANEXO 1.3. COMPOSICION DE NICOTINA

Muestras.	Peso seco reducido en mg.	Porcentajes de nicotina en peso seco				Valores absolutos en g			% de nicotina en el líquido con prolinea total.		
		En el polvo.	En el líquido	Total	Polvo.	Líquido.	Total				
10 mg/1 de prolinea.	(154,8)	2,49	(2,67)	2,56	(2,75)	5,05	(5,42)	2046,7	2107,5	4154,2	50,7
10 mg/1 de prolinea.	(137,2)	1,46	(1,56)	2,14	(2,29)	3,6	(3,85)	1008,8	1480	2488,8	59,4
10 mg/1 de prolinea.	(143,4)	1,01	(1,94)	2,55	(2,7)	4,36	(4,68)	1379	1944,1	3323,3	58,5
10 mg/1 de prolinea.	(142,3)	2,16	(2,31)	2,25	(2,41)	4,41	(4,73)	1270	1323	2593,1	51
VI	(139,9)	1,18	(1,26)	1,8	(1,93)	2,98	(3,2)	785,9	1201	1986,9	60,4

con los 100 gr /l de sacarosa) resultando mucho más eficaz que la prolina.

Las variantes con las dos sustancias, tanto en la proporción 5 más 5 como 10 más 10, dieron resultados intermedios entre los obtenidos para estos compuestos aislados. No se descubre, pues, ninguna acción sinérgica. El ácido nicotínico sólo, resulta ~~más~~ más eficaz que acompañado de prolina. La mezcla 10 más 10 mg más eficaz que 5 más 5.

El porcentaje de la nicotina que se encuentra en el líquido de cultivo con relación a la total, es superior, en todos los casos, al 50%. Pero, en esta experiencia, es la nicotina del polvo la que va paralela al ~~la~~ porcentaje total, resultando la retenida por la raíz más significativa que la vertida al medio para ver la acción de prolina y ácido nicotínico. (En las demás experiencias recordaremos que ocurría todo lo contrario: era el alcaloide de la solución de cultivo el que nos indicaba el grado de influencia de las variantes experimentales)

Influencia sobre el contenido en N

Cuadros números 32 y 33 y gráficos n^{os} 31 y 33.

El porcentaje total de N es más elevado que en el testigo con los 10 mg. de ácido nicotínico. Para los demás medios es bastante parecido al de los cultivos en WI. Su curva marcha casi paralelamente a la de pesos.

El N alcaloideo es más elevado que para el medio "standard" en todas las variantes, pero mientras el aumento es pequeño para los 20 mg de prolina, es bastante acentuado en todos los casos en que hay ácido nicotínico. El N alcaloideo sube con los 10 mg / l de ácido nicotínico y desciende en los demás medios. Muestra la curva del primero casi un perfecto paralelismo con la de nitrógeno total. La del no nicotínico desciende con la presencia de prolina.

INFLUENCIA DE LA PRESIONCIA ANTITUMORAL DEL ACIDO NICOTINICO Y PROLINA SOBRE EL CONSUMIDO EN NROBUSTEZAS Y PESO SEXO

	Peso seco redu- cido en kg	N total del polvo.	N alcoholico del polvo.	N alcoholico por cultivo.	N total por cultivo.	N no alcoholi- deo.
Medios.						
10 mg. ac. ni- cot.	(154,8	3,72	(3,70)	0,43	(0,427)	0,87
					(0,86)	4,82
					(4,79)	3,35
					(3,93)	
10 mg. prolina	(137,2	3,80	(3,78)	0,45	(0,248)	0,62
					(0,61)	4,17
					(4,15)	3,55
					(3,53)	
5 mg de ac. ni- cot 5 o prol.	(143,4	3,91	(3,89)	0,31	(0,308)	0,75
					(0,74)	4,35
					(4,33)	3,60
					(3,58)	
10 mg. ac. ni- cot 0 prol	(142,3	3,92	(3,90)	0,37	(0,308)	0,75
					(0,74)	4,29
					(4,27)	3,54
					(3,52)	
VI	(139,9	3,84	(3,82)	0,20	(0,199)	0,51
					(0,50)	4,15
					(4,13)	3,64
					(3,62)	

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA SISTEMÁTICA DE AGUO NICOTINICO Y PROTEINA

ABRIL DE 1960 EN N.º

Valores absolutos en										Relaciones entre las distintas clases de N			
Medio	Peso real en mg.	N.º total del polvo.	N.º al polvo.		N.º total.	N.º total por cultivo.	N.º de al- coloides	N.º al- co- lico a total de polvo.	N.º al- co- lico a total de cultivo.	N.º al- co- lico a total de polvo.	N.º al- co- lico a total de cultivo.		
10 mg/1 nicot.	82,2	3600	353,7	364,2	717,9	3964,3	2246,3	9,32	18,2	22,1			
10 mg/1 proteína	69,1	2630	174,4	255,8	430,2	2885,8	2455,6	6,63	14,9	17,5			
5 mg. nicot. 5 mg. lina.	76,2	2980	238,2	336	574,2	3316	2741,8	7,97	17,3	20,9			
10 mg. nicot. 10 mg. proteína	58,8	2300	219,5	228,2	447,7	2526,2	2081,5	9,54	17,6	21,4			
VI	66,6	2560	135,8	207,5	343,3	2767,5	2424,2	5,3	12,4	14,1			

von ácido nicotínico; algo mas baja, aunque tambien superior a la
VI, es la relación para el medio con prolina sola.

Es decir, todos los medios ensayados hacen desviarse hacia la
via alcaloidea una mayor proporción del N que el medio testigo.

Tanto el ácido nicotínico como la prolina proporcionan un incre-
mento de N al medio nutritivo. Los 10 mg. de ácido nicotínico aper-
tan 1138 ✓ por litro y los de prolina 1686 ✓. El nitrógeno total
por cultivo aumenta en 1196,7 ✓ con el ácido nicotínico, aumento
que se distribuye en: 374,6 ✓ de nitrógeno alcaloideo y 822,1 ✓ de
nitrógeno no alcaloideo.

Parace como si el exceso de N del ácido fuera utilizado total-
mente por la raíz.

Pero en cambio, las 1686 ✓ que proporciona la prolina, sólo se
traducen en un aumento del N total de 118,3 ✓ distribuidas en :
86,9 de N nicotínico y 31,4 de N no alcaloideo.

Resumiendo: Para nosotros, tanto el ácido nicotínico como
la prolina hacen aumentar el porcentaje total de nicotina formada
por las raíces de Nicotiana glauca L., cuando su concentración
en el líquido de cultivo es de 10 mg / l. A concentración menor
(2 mg / l) no ejerce acción positiva.

El ácido nicotínico se muestra mucho más eficaz que la proli-
na y que la mezcla de ambas sustancias.

La prolina, acompañando al ácido nicotínico no sólo no favore-
ce ni suple su acción alcaloide - formadora, sino que parece que
la perjudica, puesto que las mezclas 5 más 5 y 10 más 10 mg/l. son
menos eficaces que los 10 mg. de ácido nicotínico sólo.

Respecto a la prolina concuerdan nuestros resultados con los
de otros autores /Klein y Linser (.); Dawson (15)/; no en
cuanto al ácido nicotínico cuya acción se pone en duda /Dawson (15);
Ciferri y Pratesi (..)/. Para nosotros es indudable que esta sustan-
cia favorece enormemente la formación de nicotina, mucho más inten-
samente que la prolina.

(.) Citados de James en "The Alkal." (1).

(..) En Ciferri (10)

Cultivo de raíces de Nicotiana glauca
Graham y Nicotiana sylvestris Speg. et
Com. para comprobar si forman alcaloides
en las condiciones de cultivo "in vitro"

Iniciamos su cultivo:

El 12 de marzo de 1.953 el de las de N. glauca, a partir de semillas que nos fueron proporcionadas por el "Jardín Botánico" de Madrid; el 3 de junio de 1.953 el de las N. sylvestris de semillas procedentes del "Instituto de Biología del Tabaco" de Sevilla.

Ensayamos para ambas especies los medios de White y de Morel, y del primero algunas variantes en las que habíamos sustituido la sacarosa propia del medio tipo por glucosa o maltosa.

Las raíces de N. glauca viven bien en los dos medios, mejor en el VI; las de N. sylvestris sólo en este último y bastante precariamente.

El azúcar más conveniente resultó la sacarosa para ambas. Los otros dos ensayados se mostraron totalmente inadecuados para N. sylvestris; pero N. glauca, si bien puede utilizar todos, resulta poco conveniente la glucosa, que da raíces con aspecto anormal (semejante al que observábamos que tomaban las de berenjena en nuestro trabajo sobre influencia de los azúcares sobre las raíces de esta planta (4)); la maltosa hace que al principio se presenten también variaciones e hipertrofiadas, pero después parece que se habitúan y las nuevas raicillas formadas resultan normales.

Actualmente (19 de julio de 1.955) conservamos dos cepas de N. glauca, cultivada una en medio VI (la nº 1 que va por su 10ª reproducción) y en Morel la otra (la nº 6 reproducida hasta hoy 7 veces). Algunos cultivos de la cepa 1 los mantenemos en VI con maltosa en vez de sacarosa. Llevan estas raíces en cultivo casi dos años y medio.

De N. sylvestris sólo conservamos la cepa nº 53 (en su 6ª re-

tarda que en N. tabacum. Su desarrollo es lento, esp. el crecimiento el de N. sylvestris, y además tardan bastante en recuperarse y reanudar el crecimiento después de las manipulaciones inherentes a aquella operación.

Formación de alcaloides

Hacemos su determinación como para N. tabacum, estimándolos como nicotina (La anabasina propia de N. glauca y la nornicotina que pudiera haber en las raíces de N. glutinosa, como alcaloides que llevan el núcleo de la piridina, darán la reacción con el bromuro de cianógeno como la nicotina. No intentamos separarlos)

Como siempre, analizamos el polvo de las raíces desecadas y el caldo de cultivo gastado. Los datos para el líquido no serán aquí tan rigurosamente exactos como eran para los cultivos de N. Tabacum. Al iniciar una experiencia sobre esta especie, lo hacíamos con un ápice radicular aislado, de masa despreciable frente a la que se recogía al terminar el periodo de cultivo, que podíamos considerar se había formado totalmente dentro de aquel líquido con el que debía haber hecho todos los cambios metabólicos. Aquí nos limitamos a determinar el alcaloide que se encuentra en el líquido por el que pasó un cultivo reserva entre dos resiembra, siendo una masa algo considerable de trama radicular la que tomamos normalmente para conservar las cepas, la cual llevará cierta cantidad de alcaloide y habrá dejado también en el líquido anterior parte del que hubiera formado. Estas cantidades serán pequeñas frente a la que después forme la raíz cuando crezca, pero no despreciables.

Encontramos:

Para N. glauca

En el polvo	:	0,66 %
" " líquido	:	1,70 "
Total :		2,36 "

" " líquido : 3,92 "

Total : 4,70 "

Como vemos, también las raíces de estas especies forman al-
coloides cuando se encuentran aisladas del brote, como las de N.
Tabacum, y, también como éstas, vierten al medio de cultivo gran-
des proporciones de los mismos, mucho mas de lo que retienen.

VIII.- CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LOS RESULTADOS

DE LA TOTALIDAD DE LAS EXPERIENCIAS.

1ª.- Sobre el desarrollo de las raíces de Nicotiana Tabacum L. cultivadas "in vitro" influyen muchos factores.

Los que más intensamente afectan al crecimiento, son:

a) La temperatura. Es esencial. Hemos observado un desarrollo muy activo entre 32° - 37° C. Cuando se eleva o disminuye, se retarda el crecimiento. El mínimo que permite la recuperación ulterior de las raíces son los 25°.

b) Muy importante es también el pH. Las raíces de tabaco son muy sensibles a sus cambios. El óptimo se encuentra entre 5,3 - 5,5. La elevación de una unidad apenas es tolerada y no consienten en absoluto el descenso.

c) La sustitución de los nitratos del medio nutritivo por sales anónicas, solo permite que vivan precariamente las raíces, cuya masa aumenta muy poco.

d) La reducción de la proporción en que las distintas sales entran en nuestra solución nutritiva "standard" produce, en unos casos, aumento del crecimiento (cloruros y potasio si la reducción no es muy intensa; fosfatos y calcio siempre); en otros, disminución (nitratos, sulfatos y sobre todo Fe). La del Mg, resulta indiferente.

e) El aumento de la proporción de nitratos, cuando no es muy grande, hace elevarse ligeramente el peso; si se acentúa, le hace disminuir.

f) El aumento de la proporción de azúcar influye favorablemente hasta la concentración de 75 gramos por litro; sobrepasada esta

raíces.

2ª.- Las raíces de tabaco cultivadas "in vitro" producen cantidades considerables de nicotina como había sido observado ya por Dawson (17).

3ª.- Las sucesivas resiembras y edad de la raíz en cultivo no hacen disminuir el ritmo de la producción del alcaloide.

Observamos valores semejantes para los cultivos en WI de las primeras experiencias derivadas de las raíces en su 8ª y 9ª resiembra y en las últimas que procedían de cultivos en la resiembra 26ª.

4ª.- Cantidades considerables de nicotina se encuentran siempre en el líquido de cultivo metabolizado, según había observado también Dawson (17).

En nuestro caso, es casi siempre mas del 30% del total producido por un cultivo la que se encuentra en la solución nutritiva gastada. Los pocos casos en que era menor esa proporción coincidían con un porcentaje total muy bajo y casi siempre (excepto para el caso de la reducción del Mg_{2+}) con un desarrollo muy deficiente de la raíz.

5ª.- Las distintas variantes experimentales que hemos estudiado influían sobre el porcentaje total de nicotina -en sentido positivo unas, negativo otras- en relación con el hallado para los cultivos testigo en medio WI normal.

Favorecían la formación de nicotina:

a) La edad de un cultivo cuando ha vivido en condiciones óptimas.

b) La reducción de fosfatos, cloruros y hierro.

e) La elevación del pH.

f) La adición de prolina y ácido nicotínico.

Hacían disminuir su porcentaje:

a) Las condiciones nutritivas desfavorables.

b) La reducción de nitratos, sulfatos, magnesio, calcio y potasio.

c) La reducción de la proporción de sacarosa.

d) La sustitución de los nitratos por sales amónicas.

Como valores extremos encontramos:

Mínimo: 0,74 % hallado en los cultivos con sales amónicas en vez de nitratos.

Máximos: { (5,3 % para los cultivos con 100 gr./l. de sacarosa.
(5,05 " Con la adición de 10 mg/l de ácido nicotínico

Los porcentajes para los testigos de las distintas siembras fueron:

Mínimo ————— 2,78 %

Máximo ————— 3,92 "

Medio ————— 3,2 "

Reducidos los valores anteriores al valor medio de los testigos resultan:

Mínimo: (1,39) para sales de amonio.

Máximos: { (5,1) " 100 gr./l. de sacarosa.
(5,42) " 10 mg/l. de ac. nicotínico.

Los factores que más influyen sobre la formación de nicotina son por tanto:

Las sales amónicas, que resultan poco aptas para la formación del alcaloide.

La abundancia de carbohidratos y la adición de ácido nicotínico que la favorecen mucho.

62.- El efecto de los distintos factores se ve mucho mejor teniendo en cuenta la nicotina total (de la raíz y del líquido de

tivos. La cantidad que en el se encuentra, no es fija (aunque los valores extremos no difieran mucho) ni guarda proporcionalidad ninguna con las variaciones en intensidad de un mismo factor o las condiciones favorables o desfavorables del medio. El máximo contenido nos lo dió la adición de ácido nicotínico; el mínimo las sales de amonio. Los valores extremos coinciden con los datos para nicotina total, pero no ocurre lo mismo si comparamos todos los resultados.

Si consideramos la relación: $\frac{\text{nicotina en el líquido}}{\text{nicotina total}}$, observamos que, de las 39 variantes experimentales estudiadas, tan sólo en 7 era menor del 50% y además, a grandes rasgos, podemos decir que cuanto mayor es el porcentaje total del alcaloide es también mayor esa proporcionalidad, de manera que la curva que la expresa viene a ser paralela a la de nicotina total. Este paralelismo es perfecto en las experiencias en que las distintas variantes sólo representan modificaciones en intensidad de un mismo factor (concentración de nitratos, concentración de sacarosa, etc.); no tan perfecta cuando esas variantes se refieren a factores distintos (reducción de aniones, de cationes, etc.).

Solo en dos casos hemos encontrado una proporcionalidad inversa: en la experiencia de sustitución de nitratos por sales amónicas, y, en la de adición simultánea de prolina y ácido nicotínico.

El hecho de encontrarse tan gran cantidad de nicotina en el líquido y en proporción casi siempre ascendente con la cantidad total formada debe tener algún significado fisiológico.

Si es realmente la raíz el único órgano formador del alcaloide, parece ser que cumple su misión a la perfección en las condiciones del cultivo "in vitro" y podríamos suponer que la nicotina que se encuentra en el medio es la que la raíz hubiera enviado al brote en condiciones normales. (La proporción de nicotina en las hojas del tabaco en relación con el total por planta, es de un 85 - 88 %

el xilema, como parece probó Dawson (..), toda la nicotina de los líquidos de nuestros cultivos habría ido pasando al medio por las secciones basales de las raíces. Pero estas son muy pequeñas comparadas con la masa total que se forma por sucesiva ramificación y d biera haber habido para ello una circulación extraordinariamente intensa.

Más fácil parece pensar que el alcaloide haya difundido al medio a través de la gran superficie que presentan todas las raicillas en cuyo caso parece que la raíz haya procedido como si quisiera librarse de aquella sustancia.

7º.- Los distintos factores estudiados en nuestras experiencias ejercen también influencia sobre la proporción del nitrógeno contenido en las raíces, tanto si consideramos el porcentaje total como su distribución en alcaloides y no alcaloides y, lo mismo, si tenemos en cuenta sólo el nitrógeno de las raíces, como si estimamos también el correspondiente a la nicotina vertida al líquido.

Si nos limitamos al nitrógeno del polvo, encontramos:

a) Para nitrógeno total

Influencia ⁺positiva de:

Tiempo de cultivo en condiciones óptimas.

Reducción de fosfatos y cloruros.

Aumento de nitratos.

Disminución de la concentración de sacarosa.

Adición simultánea de ácido nicotínico y prolina.

En sentido negativo influyen:

Las condiciones nutritivas generales desfavorables.

La reducción de nitratos Ca y Fe.

El aumento de la concentración del azúcar.

Las sales amónicas frente a los nitratos.

(*) Ref. de Leo Marion en "The Alk." (1)

(**) " " James " " "

Mínimo — 2,27 % ((2,27) reducido a valor común para testigos) en los cultivos de tres meses, en WI, sin renovar la solución nutritiva.

Máximo — 4,4 % (4,16 reducido) para el medio con 10 veces aumentados los nitratos.

Valores correspondientes para los cultivos testigo de todas las experiencias

Mínimo. ——— 3,56 %

Máximo. ——— 4,04 "

Medio. ——— 3,82 " (a este valor medio para el testigo reducimos las de todas las variantes experimentales).

b) Para nitrógeno alcaloides

Aumenta con:

La reducción de cloruros y del hierro y la reducción extrema de nitratos.

La adición de sacarosa.

La adición de ácido nicotínico y prolina, tanto independiente como simultáneamente.

Disminuye con:

El tiempo de cultivo en condiciones óptimas (no muy claro).

Las condiciones nutritivas desfavorables (tampoco muy claro)

La reducción de sulfatos, calcio y la de nitratos cuando es moderada.

Con la adición de nitratos.

Con la reducción de sacarosa.

Con la sustitución de los nitratos por sales amónicas.

La reducción de potasio, magnesio y fosfatos resulta indiferente.

Adición de 10 mg./l. de ácido nicotínico, el máximo. ————— 0,43 " (0,40 reducido)

Los encontrados para los cultivos testigo fueron:

Mínimo 0,16

Máximo 0,26

Medio 0,19

c) Para nitrógeno no alcaloideo

Aumenta algo con el tiempo de cultivo (resultados poco claros); con la reducción de sulfatos, fosfatos, cloruros y potasio; con el aumento de nitratos si es acentuado (su duplicación resultaba indiferente); con la disminución de sacarosa y con la adición de ácido nicotínico si no va acompañado de prolina.

Disminuye mucho con las condiciones nutritivas desfavorables, reducción de nitratos, calcio, magnesio y hierro, aumento de sacarosa, sustitución de nitratos por sales amónicas y adición de prolina, sola o acompañada de ácido nicotínico.

Los valores extremos fueron:

Mínimo ——— 2,08 % (reducido 2,08) para tres meses de cultivo en WI sin renovar.

Máximo ——— 4,21 % (reducido 3,99) para exceso de nitratos (10 veces la concentración tipo).

Los correspondientes a los cultivos testigo de todas las experiencias:

Mínimo ——— 3,35 %

Máximo ——— 3,84 "

Medio ——— 3,64 "

Si tenemos en cuenta y consideramos como asimilado por la raíz, el nitrógeno de la nicotina del líquido de cultivo, los datos correspondientes a nitrógeno total y a nitrógeno alcaloideo no serán los mismos y tendremos:

a) Para nitrógeno total

Influyen favorablemente:

La adición de nitratos.

Toda modificación positiva o negativa de la concentración de azúcar en el medio.

También la adición de ácido nicotínico y prolina.

En sentido negativo actúan:

Las condiciones nutritivas desfavorables, la reducción de nitratos, calcio y magnesio y el empleo de sales amónicas en sustitución de los nitratos.

Casi indiferente resulta la reducción de sulfatos, fosfatos y hierro.

El mínimo y máximo para este concepto correspondió a:

3 meses de cultivo sin renovación, el mínimo ---- 2,38% (2,38)

Adición de 10 mg. de ácido nicotínico o aumento de nitratos

hasta 10 veces los

máximos: { 4,82% (4,79 reducido) para ac. nicotínico.
(4,83" (4,58 ") para nitratos.

En los cultivos en WI en todas las experiencias hallamos:

Mínimo ----- 3,95 %

Máximo ----- 4,41 "

Medio. ----- 4,21 "

b) Para N alcaloides total

Aumenta con:

El tiempo de cultivo en condiciones óptimas (ligeramente)

La reducción de cloruros, fosfatos (casi indiferente) y hierro.

El aumento de nitratos.

El aumento de sacarosa.

La adición de ácido nicotínico y prolina.

Disminuye con:

Las condiciones nutritivas generales desfavorables (dudoso)

Reducción de nitratos, sulfatos, potasio, calcio y magnesio.

Reducción de sacarosa.

Sustitución de nitratos por sales amónicas.

tínico.

Los encontrados para los cultivos testigo fueron:

Mínimo ——— 0,40 %

Máximo ——— 0,68 "

Medio ——— 0,53."

Al considerar el N de la nicotina del medio como integrante de la masa total de este elemento resultan más lógicos algunos de los datos hallados para nitrógeno alcaloideo o total. Así ocurre por ejemplo para los correspondientes a las variaciones de concentración de nitratos.

89.- Como consecuencia de las variaciones, en muchos casos opuestos, que sufren los porcentajes de nitrógeno alcaloideo, no alcaloideo y total con las distintas variantes a que fueron sometido los cultivos, las proporciones relativas de las distintas clases de nitrógeno, como es lógico, también se modifican con ellas.

La relación $\frac{N \text{ alcaloideo total}}{N \text{ total}}$ se ve afectada en sentido positivo por:

Las condiciones nutritivas desfavorables (poco claro)

La reducción de cloruros, nitratos, hierro y fosfatos (la de estos últimos es casi indiferente)

El aumento de sacarosa

La adición de prolina y ac. nicotínico.

En sentido negativo por:

Tiempo de cultivo en condiciones óptimas (poco claro)

Reducción de sulfatos, calcio, potasio y magnesio.

Aumento de nitratos.

Reducción de sacarosa.

Sustitución de nitratos por sales amónicas.

Los valores extremos para esta relación fueron:

Mínimo 3,5 % para el medio con sales amónicas.

Mínimo ——— 11,1 %

Máximo ——— 18,5 "

Medio ——— 12,92 "

Teniendo en cuenta solamente el nitrógeno de la raíz (alcaloides y total) la anterior relación sigue teniendo su valor mínimo para sales de amonio (1,96 %), mientras que el máximo (10,03 %) lo dan los cultivos de dos meses sin renovación.

(Los cultivos en VI dieron: mínimo 4,36%; máximo 6,6% y medio 5,24 %).

Para otras variantes se hallan bastantes diferencias entre las proporciones: $\frac{N \text{ alcaloides total}}{N \text{ total}}$ y $\frac{N \text{ alcaloides del polvo}}{N \text{ total del polvo}}$ y parece ser más convincentes los resultados obtenidos para la primera.

En todo caso la proporción de N que utiliza la raíz para la formación del alcaloide es bastante considerable.

Respecto a la relación: $\frac{N \text{ alcaloides total}}{N \text{ no alcaloides}}$, se ve favorecida por la reducción de sulfatos, cloruros y hierro; por cualquier modificación (reducción o aumento) de los nitratos; por el aumento de sacarosa y por la adición de prolina y ácido nicotínico.

Enco, en cambio, desviarse el N hacia proteínas:

La reducción de sulfatos, potasio, calcio, magnesio y sacarosa y, sobre todo, la sustitución de los nitratos por sales de amonio.

Los efectos del tiempo de cultivo y condiciones nutritivas desfavorables son muy dudosos.

Los valores extremos se debieron:

Al empleo de sales amónicas como fuente de nitrógeno, el mínimo 3,8%

Al aumento de concentración de la sacarosa hasta 100 gr./l., el máximo 19,7 %

Para los cultivos en VI obtuvimos:

90.- El nitrógeno amónico no es equivalente al nítrico para las raíces de tabaco y ejerce incluso acción tóxica sobre ellas. Resultó también muy poco apto para la formación de nicotina (véase, como hemos visto, los valores más bajos de todas las experiencias).

100.- Las raíces de tabaco en cultivo "in vitro" pueden utilizar el nitrógeno orgánico del extracto de levadura, cuando encuentran deficiencia de nitrógeno nítrico.

Este N orgánico permite la formación del alcaloide en proporción poco inferior a la que se encuentra en los cultivos que disponen de abundancia de nitratos.

110.- Las raíces de Nicotiana glauca Grah. y de Nicotiana sylvestris Speng. et Com. pueden vivir indefinidamente "in vitro" en el medio WI.

120.- La sacarosa es el azúcar más favorable para su cultivo.

130.- Como las de N. Tabacum L. producen alcaloides aisladas del brote en las condiciones del cultivo "in vitro".

140.- Como las de esta planta también vierten al líquido que las baña gran cantidad del alcaloide formado.

NOTA BIBLIOGRÁFICA

- 1.- The Alkaloids, 1952, Ed. por Manske, R.H.F. y Holmes, H.L.
Acad. Press Inc., New York City.
- 2.- Arnon, D.I., 1937, Ammonium and nitrate nitrogen nutrition,
Soil Sci., 44, 91.
- 3.- Bausá, M., 1953, Sobre el cultivo "in vitro" de raíces aisladas de berenjena, Farmacog. XIII, 33.
- 4.- _____ 1954, Influencia de los azúcares en el cultivo "in vitro" de raíces aisladas de berenjena, An. de Edaf. y Fisiol. veg., XIII, números 7-8, 601.
- 5.- Blank, F., 1945, Alkaloïdbildung in der Pflanzenwurzel, Experientia, 1, 111.
- 6.- Borbolla y Canoyán, 1950, La preparación de soluciones nutritivas, Bol. INIA N° 23.
- 7.- Braun, Armin G. y Morol, G., 1950, A comparison of normal, habituated and Crown-gall Tumor Tissue Implants in the european Grape, Am. Jour. Bot., 37, 7, 499.
- 8.- Carrel, A., 1923, Nouvelle technique pour la culture des tissus, Compt. Rend. Soc. Biol. Paris, 89, 1017.
- 9.- _____ 1937, Le present et l'avenir de la cytologie experimen-

- 10.- Ciferri, R., 1947, Sintesi degli alcaloidi nelle piante di tabacco, "Il Tabacco", (Inst. Scient. Sper. per i Tabacchi, Roma), pag. 24.
- 11.- Ciferri, R. y Scaramuzzi, G., 1947, "Il Tabacco" pag. 5.
- 12.- Codounis, 1951, Chronological and topographic aspects of the formation of nicotine in the tobacco seedlings, Ann. Inst. Exptl. Tabac. Bergerac 1, 2, 135.
- 13.- Chase, J. 1927, Sur l'apparition et la localisation de la nicotine dans la plantule de tabac., Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 185, 80.
- 14.- Dawson, E.F., 1938, Nitrogen nutrition and nicotine synthesis in tobacco., Bot. Gaz., 100, 336.
- 15.- _____ 1939, Influence of certain amino-acids and of nicotinic acid upon the nicotine content of tobacco leaves, Plant Physiol., 14, 479.
- 16.- _____ 1942, Accumulation of nicotine in reciprocal grafts of tomato and tobacco, Am. Jour. Bot., 29, 66.
- 17.- _____ 1942, Nicotine synthesis in excised tobacco roots, Am. Jour. Bot. XXIX, 10, 813.
- 18.- _____ 1945, An experimental analysis of alkaloid production in Nicotiana. the origin of nornicotine, Am. Jour. Bot. XXXII, 7, 416.
- 19.- _____ 1946, Development of Some Recent Concepts in the Phy-

- 20.- _____ 1952, Alkaloid biogenesis: Nicotine demethylation in excised leaves of Nicotiana glutinosa, Am. Jour. Bot. XXXIX, 4, 250.
- 21.- Belwiche, C.C., 1951, The assimilation of ammonium and nitrate ions by tobacco plants, Jour. Biol. Chem., 167.
- 22.- Duhanet, L., 1949, Action du lait de coco sur la croissance des tissus du tubercule de Topinambour cultivés in vitro, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 229, 24, 1353.
- 23.- _____ 1950, Action du lait du coco sur la croissance des tissus de Crown-gall de Noctonère cultivés in vitro, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 230, 8, 770.
- 24.- El-Rishiny, E.P.H. 1955, Absorption and Assimilation of Inorganic Nitrogen from Different Sources by Storage Root-Tissue, Jour. of Exp. Bot., VI, 16, 6.
- 25.- Frey-Wyssling, 1947, Nicotine Metabolism in Tobacco Seedlings, Proceed of the 8.th. Intern. Congress of Exp Cytol.
- 26.- Gautherot, R.J., 1934, Culture du tissu cambial, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 198, 2195.
- 27.- _____ 1937, La culture des tissus végétaux. Son état actuel, comparaison avec la culture des tissus animaux, Actual. scient. industr., Hermann edit. Paris, 1937.
- 28.- _____ 1939, Sur la possibilité de réaliser la culture infinie des tissus de tubercule de Carotte, Compt. Rend. Acad.

- 29.- _____ 1940, Recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'Ulmus campestris cultivé in vitro, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris. 210, 632.
- 30.- _____ 1940, Nouvelles recherches sur le bourgeonnement du tissu cambial d'Ulmus campestris cultivé in vitro, Compt. Rend. Acad. Sci., 210, 744.
- 31.- _____ 1942, Manuel Technique de Culture des Tissus Végétaux, Masson et Cie. Ed., Paris.
- 32.- _____ 1942, Hétéroauxines et cultures de tissus végétaux, Bull. Soc. Chim. Biol. 24, 13.
- 33.- _____ 1945, La culture des tissus, Ed. Gallimard, 2^e ed. 1945.
- 34.- _____ 1947, Action de l'acide indole acétique sur le développement des tissus normaux et des tissus de Crown-gall de Topinambour cultivés in vitro. C.R. Ac. Sci. Paris, 224, 1728.
- 35.- _____ 1948, Sur la croissance de trois types de tissus de Scorsenère: tissus normaux, tissus de Crown-gall et tissus accoutumés à l'hétéroauxine, C.R. Ac. Sci. Paris, 226, 270.
- 36.- _____ 1948, Action de l'acide indole-acétique sur le développement du trois types de tissus de Scorsenère: tissus normaux, tissus de Crown-gall et tissus accoutumés à l'hétéroauxine, C.R. Soc. Biol., 142, 774.
- 37.- _____. El cáncer vegetal, Endeavour, IX, 33, 21.

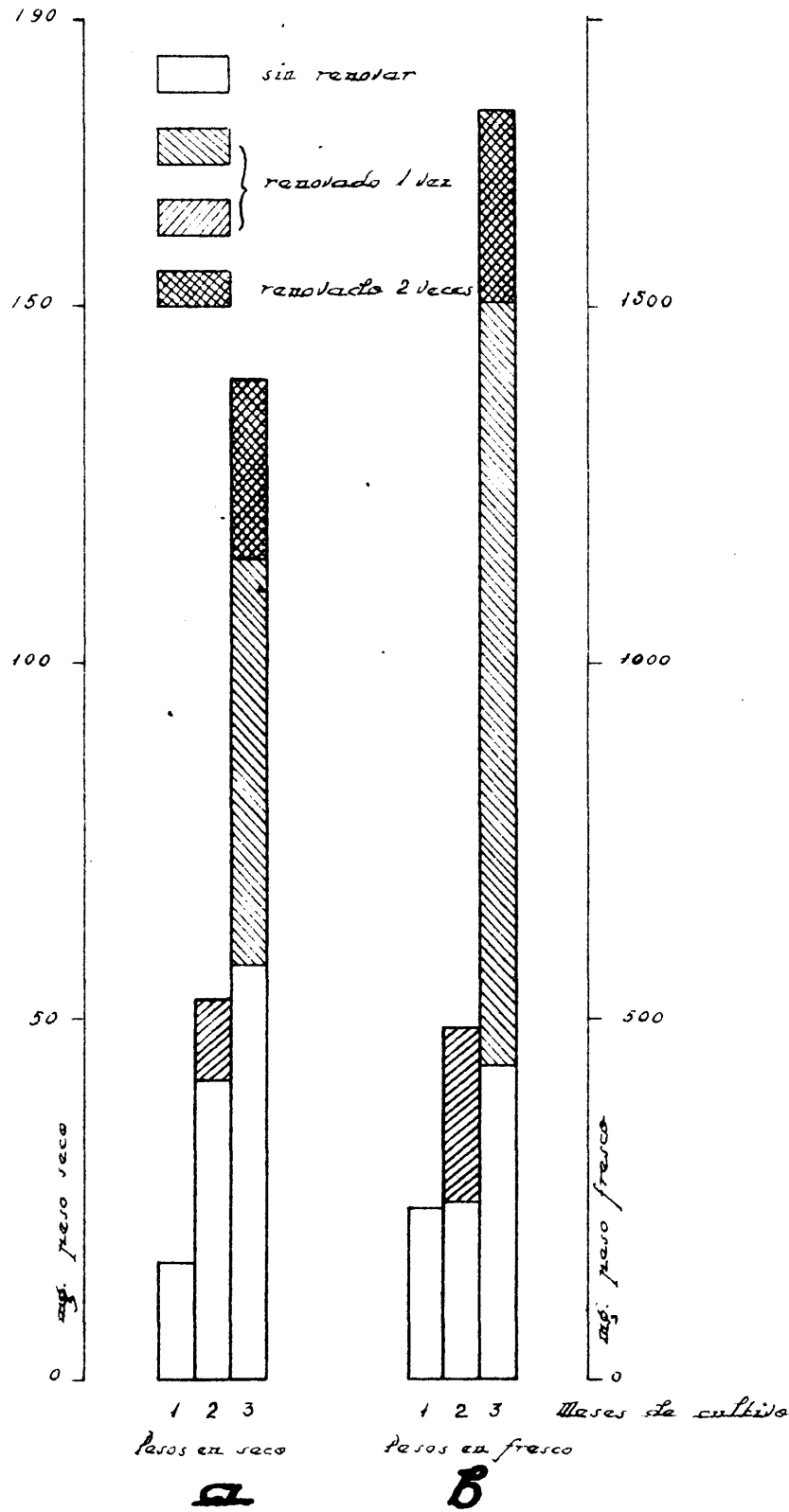
- 39.- Hildebrandt, A.C., Riker, A. J. y Duggar, B.M., 1945, Growth in vitro of excised tobacco and sunflower tissue with different temperatures, hydrogen-ion concentrations and amounts of sugar, Am. Jour., Bot., XXXII, 7, 357.
- 40.- Horner, Park y Hoover, 1934, Preparation of synthetic Humate Plant Physiol., 9, 663.
- 41.- Hutchinson, J. 1926, The Families of Flowering Plants, Mac Millan and Co. Ltd., London 1926.
- 42.- Kulescha, Z., 1947, Comparaison entre l'action du Phytomonas tumefaciens et celle de l'acide indole acétique sur des fragments de parenchyme vasculaire de Topinambour cultivés in vitro, Compt. Rend. Soc. Biol. Paris, 141, 5-6, 232.
- 43.- Lashuk, G.I. 1949. The significance of the separate parts of the root system in alkaloid synthesis by Nicotiana, Dokl. Akad. Nauk ss. ssr. 64. 145.
- 44.- Ioe, A.B. 1952, Nitrogen and aminoacids in normal, habituated, and bacteria-free Crown-gall tumor tissue cultures of grape, Plant Physiol., 27, 1, 173.
- 45.- Lewis, R. y Coy, E. 1933. Root module formation on the garden bean. Studied by a technique of tissue culture, Bot. Gaz. 95, 316.
- 46.- Luna Moreno, C. 1951, El Cultivo de raíces aisladas de Atropa belladonna L. como método en la investigación de la génesis

- 48.- Mc Evoy, E.T. 1951. The physiological aspect of major element nutrition on the maturity of flue - cured tobacco, Sci. Agri. Ottawa. 31, 3, 85.
- 49.- Morel, G. 1948, Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. Ann. des Epiphytes. Per. Pathol. Végét. Memoire n° 5.
- 50.- _____ 1950, Sur la culture des tissus de deux Monocotylédones Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 230, 11, (1950) 1099.
- 51.- _____ 1950, Sur la culture des tissus d'Osmunda cinnamomea, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris, 230, 26, 2318.
- 52.- _____ y Wetmore, R.H. 1951, Tissue cultures of monocotyledons, Am. Jour. Bot, 38, 2, 138.
- 53.- Mothes, K. 1928, Pflanzenphysiologische Untersuchungen über die Alkaloide. I Das Nikotin im Stoffwechsel der Tobakpflanze, Planta, 5, 563.
- 54.- _____ y Hiecke H., 1943, Die Tobakwurzel als Bildungsstätte des Nikotina, Naturwiss, 31, 17
- 55.- _____ y Kretsch, 1946, Über die alkaloidsynthese in isolierten Lupinenwurzeln, Naturwiss, 33, 1, 26.
- 56.- Nobecourt, P. 1939, Sur la perennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux, Compt. Rend. Soc. Biol. Paris, 130, 1270.

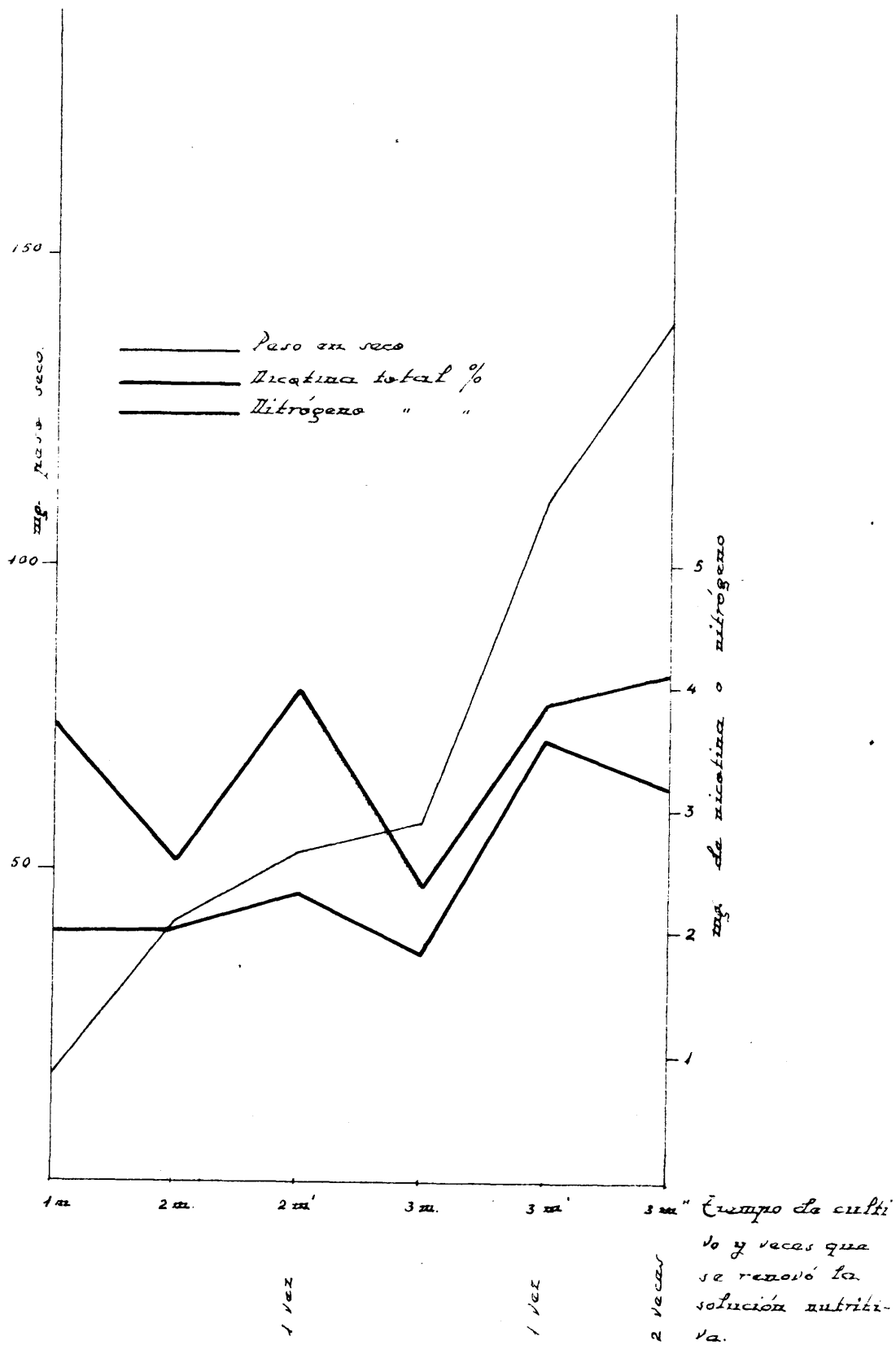
- 58.- Pal, B.P. y Nath, B. V., 1944, The accumulation and movement of nicotine in reciprocal grafts between tobacco and tomato plants. *Proc. Indian. Acad. Sci.*, B. 20, 3, 79.
- 59.- Peacock S.M., Leyerle, D.E. y Dawson, R.F. 1944, Alkaloid accumulation in reciprocal grafts of *Datura stramonium* with tobacco and tomato., *Am. Jour. Bot.*, 31, 463.
- 60.- Ropp, R.J. 1947, The response of normal plant tissue and of Crown-gall tumor tissues to synthetic growth hormones, *Am. Jour. Bot.*, 34, 2, 53.
- 61.- Schmid, H. y Serrano. M, 1948, Untersuchungen über die Nikotinbildung des Tabaks. Die Nikotinbildung im Keimling von Nicotiana glauca L., *Experientia*, 4, 311.
- 62.- Serrano, M. 1948, Contribución al estudio de la formación de nicotina en el género *Nicotiana*. I Influjo de nitratos y sales amónicas en la formación de nicotina en embriones, *An. R. Soc. Esp. Fis. Quim.*, B, 44, 763.
- 63.- _____ 1948, Contribución al estudio de la formación de alcaloides en el género *Nicotiana*. II La raíz como lugar de formación de la nicotina en las plantas de tabaco, *An. R. Soc. Esp. Fis. Quim.*, B. 44, 1197.
- 64.- Takahashi, W.W., 1947. Respiration of virus infected plant tissue and effect of light on virus multiplication. *Am. Jour. Bot.* 34, 496.
- 65.- Trapp, L. 1951, Pflanzenphysiologische Untersuchungen über

- 66.- Vickery, H., Fuchner, G.W., Wakeman, A.J. y Leavenworth, 1940, Chemical investigation of the tobacco plant VIII. The effect upon the composition of the tobacco plant of the form in which nitrogen is supplied, Bull. Conn. Agric. Exp. Sta. No. 442.
- 67.- White, Ph. R., 1934, Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium, Plant Physiol., 9, 585.
- 68.- _____ 1934, Multiplication of the viruses of tobacco and aucuba mosaic in growing excised tomato roots, Phytopathol., 24, 1003.
- 69.- _____ 1936, The cultivation of plant disease viruses in actively growing excised plant organs "in vitro", Proc. 2nd Int. Congress Microbiol., London, pp. 30-31.
- 70.- _____ Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient, Am. Jour. Bot., 26, 59.
- 71.- _____ 1943, A Handbook of Plant Tissue Culture, The Jaques Cattell Press, Lancaster, Pennsylvania.
- 72.- _____ 1945, Metastatic (Graft) tumor of bacteria free Crown-gall on Vinca rosea, Am. Jour. Bot., 32, 237.
- 73.- _____ y Braun, C. 1942, A cancerous neoplasm of plants, Cancer research, 2, 597.
- 74.- Winterstein, E. y Trier, G., 1931, Die Alkaloid.

Influencia del tiempo de cultivo y renovación de la solución nutritiva sobre el peso



influencia del tiempo de cultivo y renovación de la solución nutritiva sobre peso, contenido de nicotina y contenido de nitrógeno por ciento

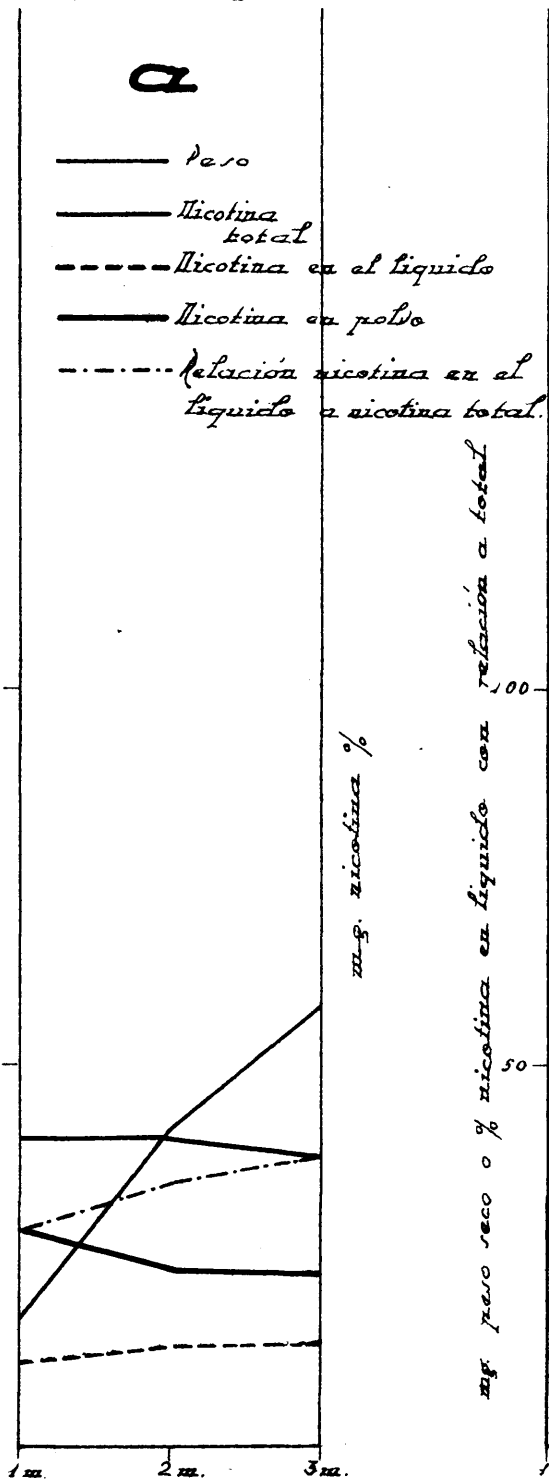


condiciones precarias
(sin renovación de la so-
lución nutritiva) y distri-
bución de nicotina

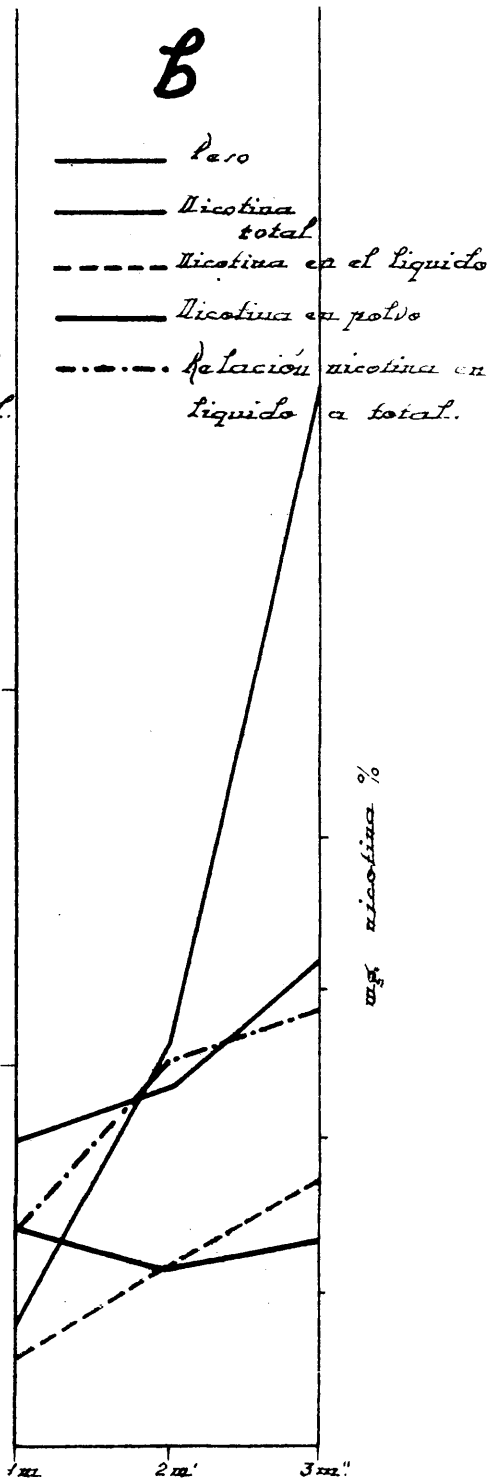
nes optimas (con renovación de
la solución nutritiva) y distri-
bución de nicotina

mg. peso seco o % nicotina en liquido con relación a total

pro de cultivo

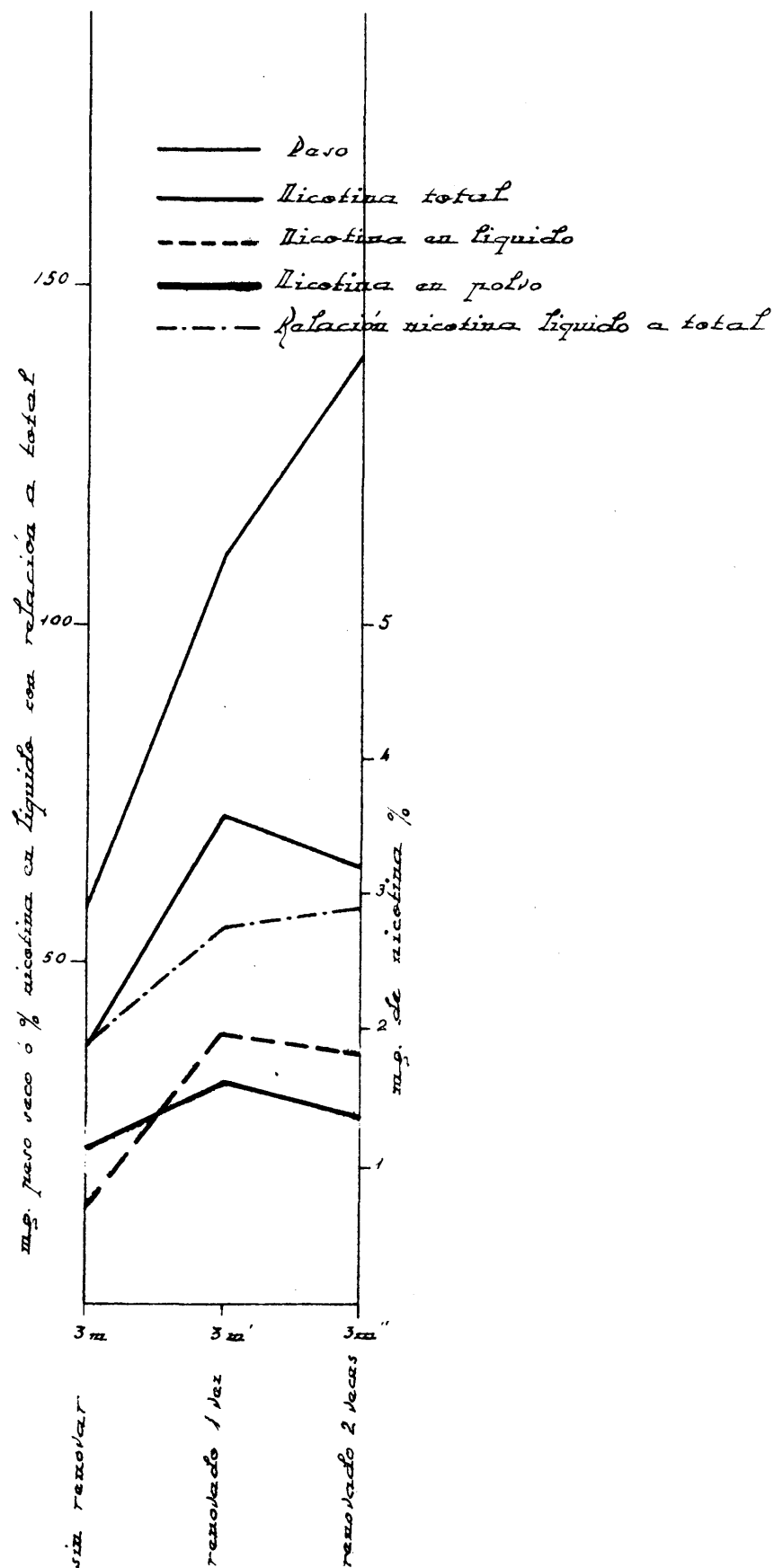


mg. peso seco o % nicotina en liquido con relación a total



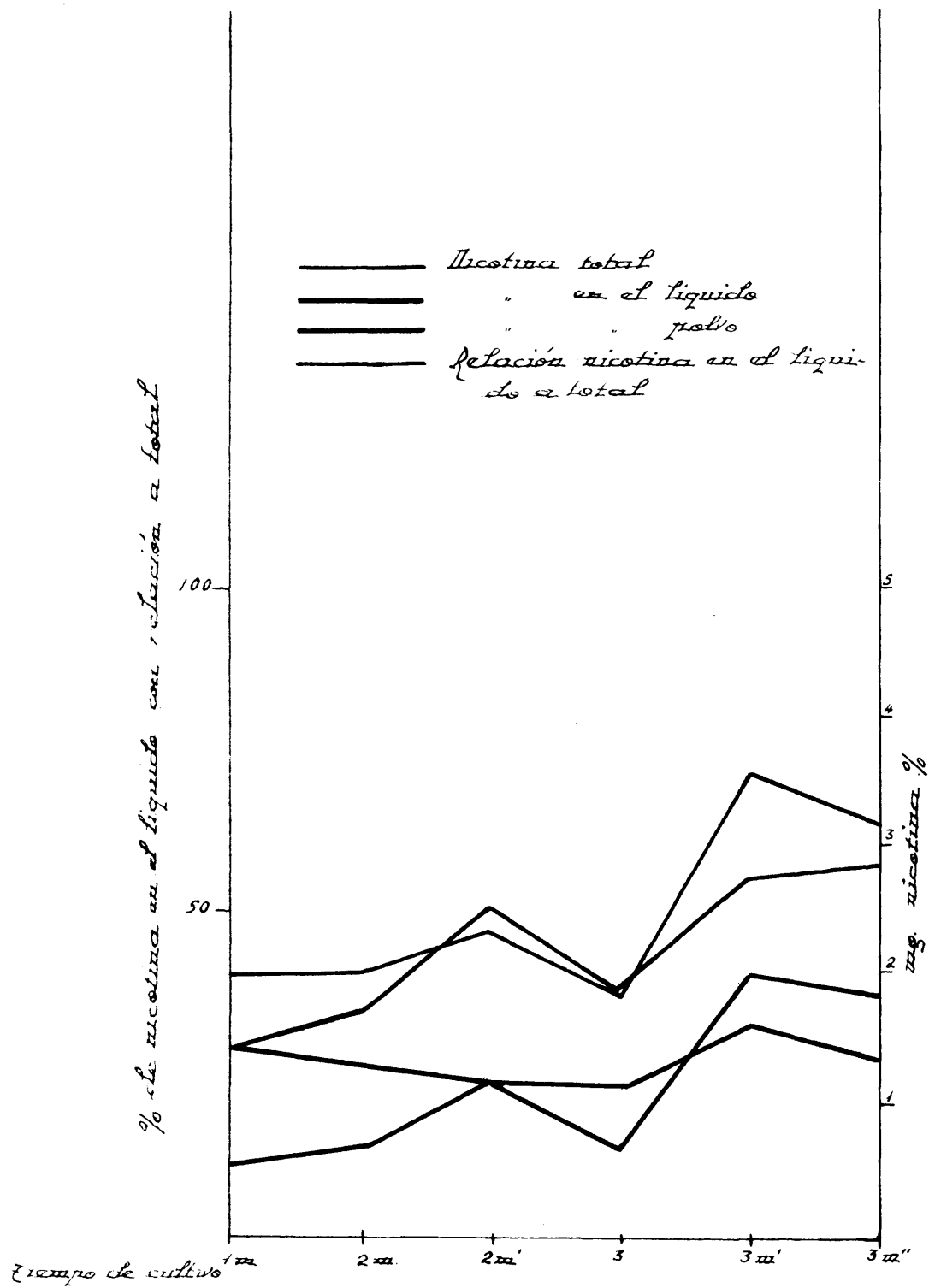
mg. peso seco o % nicotina en liquido con relación a total

Renovación de la solución nutritiva y distribución de nicotina

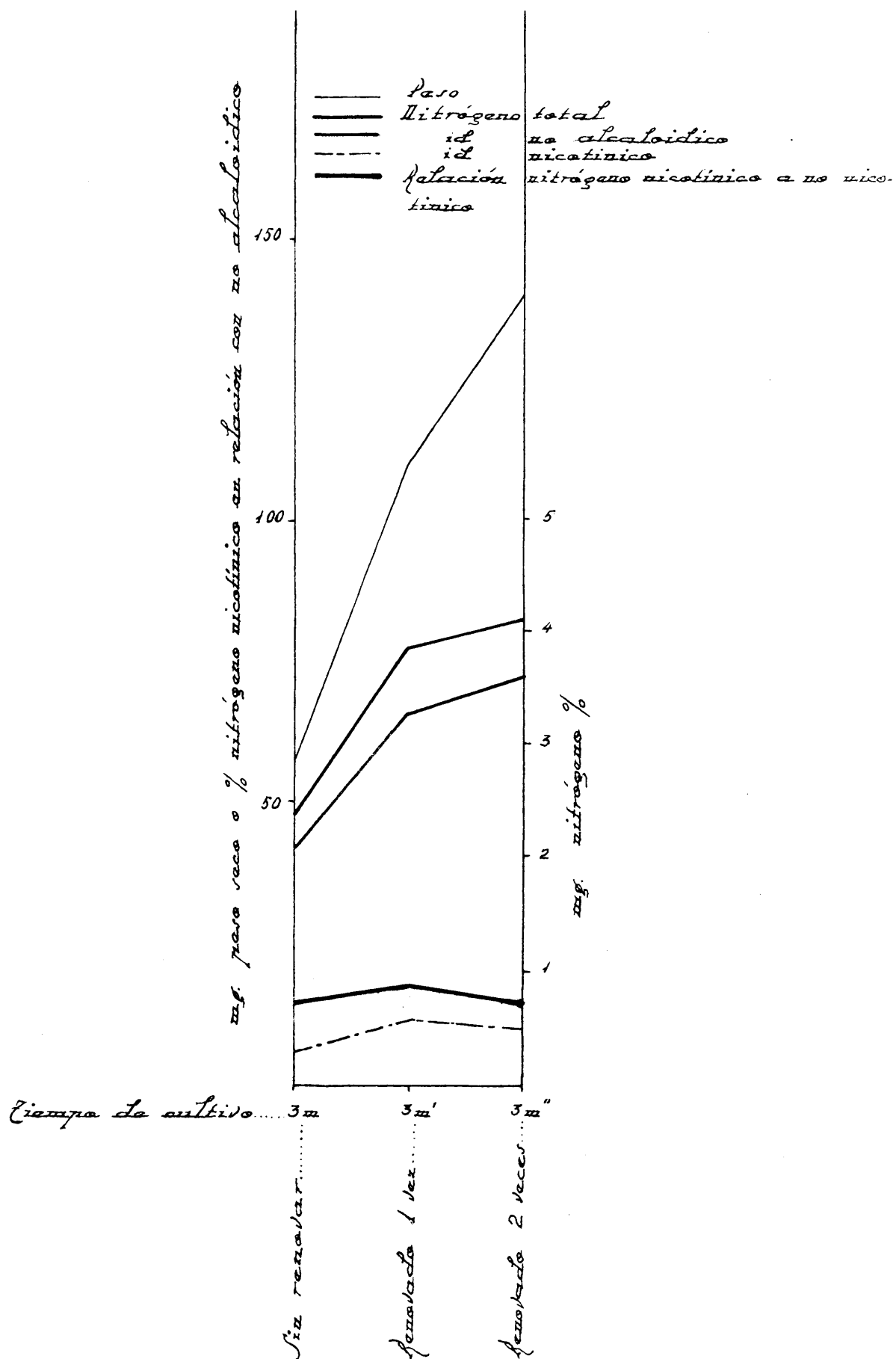


tiempo de cultivo

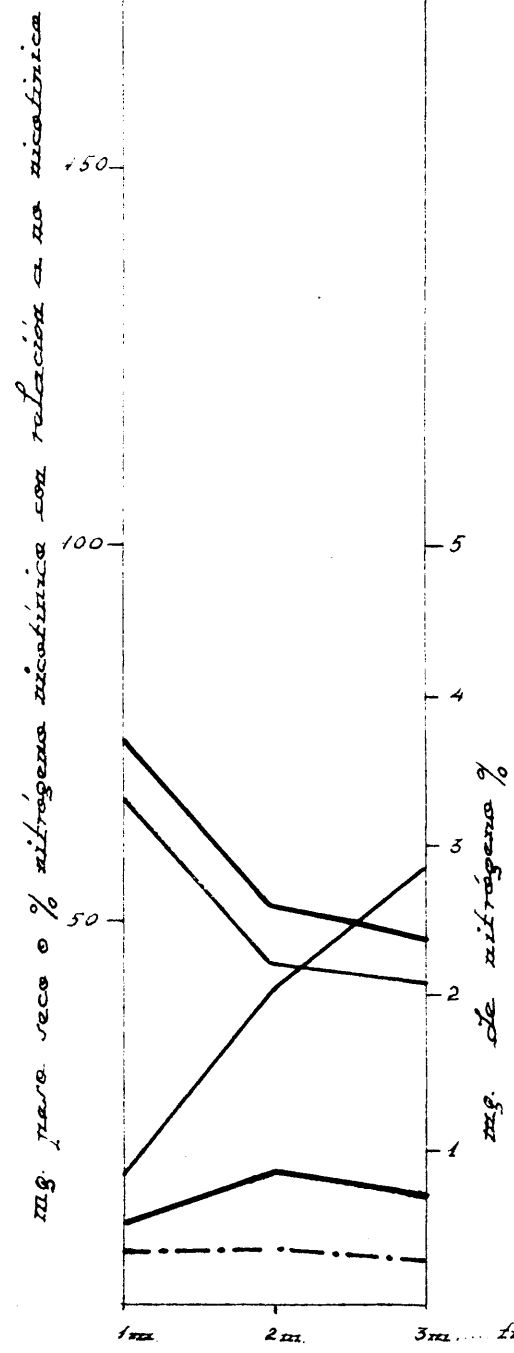
% de nicotina en el líquido con, *tarición* a total



Renovación de la solución nutritiva y distribución de nitrógeno

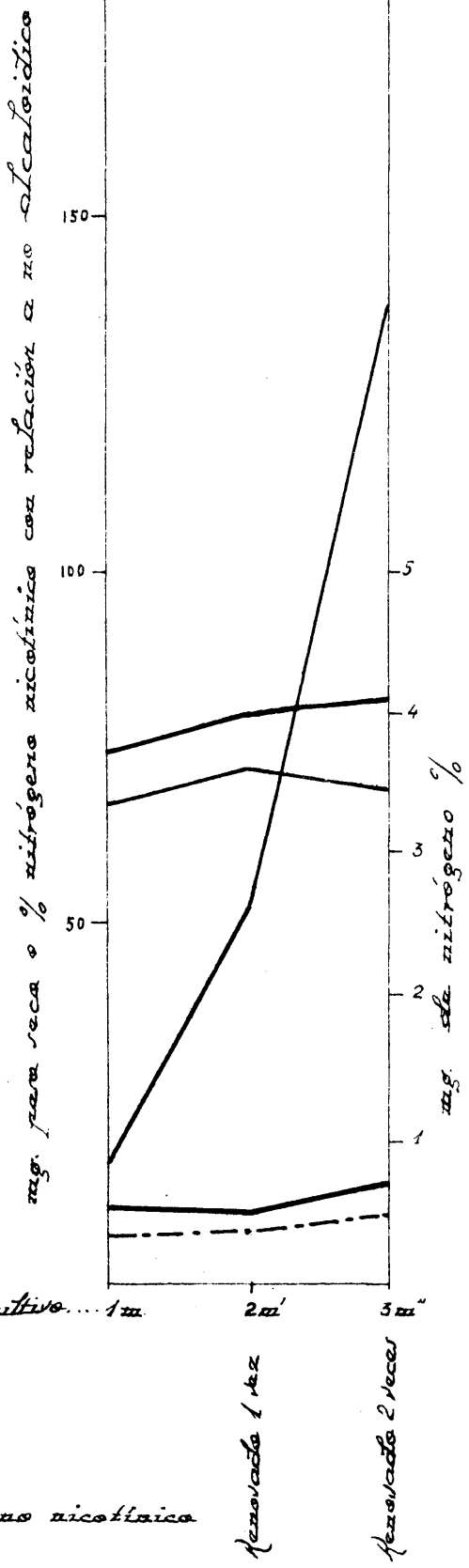


para precarias (sin renovación de la solución nutritiva) y distribución del nitrógeno.



- para
- Nitrógeno total
- Nitrógeno no alcaloídico
- Relación nitrógeno nicotínico a no nicotínico
- Nitrógeno nicotínico

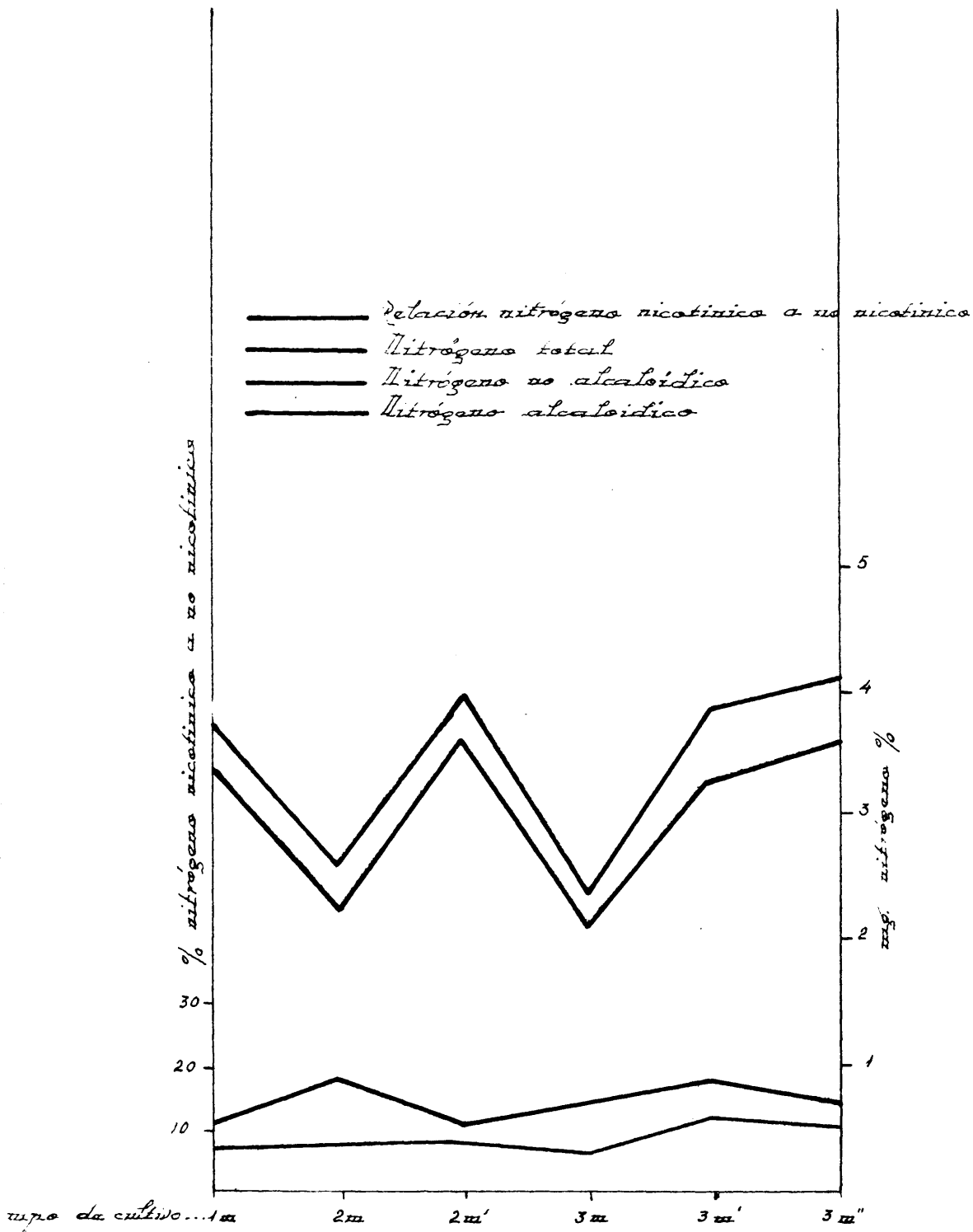
para optimas (renovación de la solución nutritiva) y distribución del nitrógeno.



Renovado 1 vez

Renovado 2 veces

de la solución nutritiva sobre distribución de nitrógeno.



a

*Reducción de aniones
y crecimiento.
Peso en seco.*

——— WI normal
 - - - - - Reducción de nitratos
 ——— id de sulfatos
 ——— id de cloruros
 ——— id de fosfatos

concentraciones

1/10 25 50

b

*Reducción de aniones
y crecimiento.
Peso en seco.*

——— Medio WI normal
 - - - - - Nitratos
 ——— Sulfatos
 ——— Cloruros
 ——— Fosfatos

WI normal

concentraciones

1/10 2 50

3000

m.g. peso fresco

2500

2000

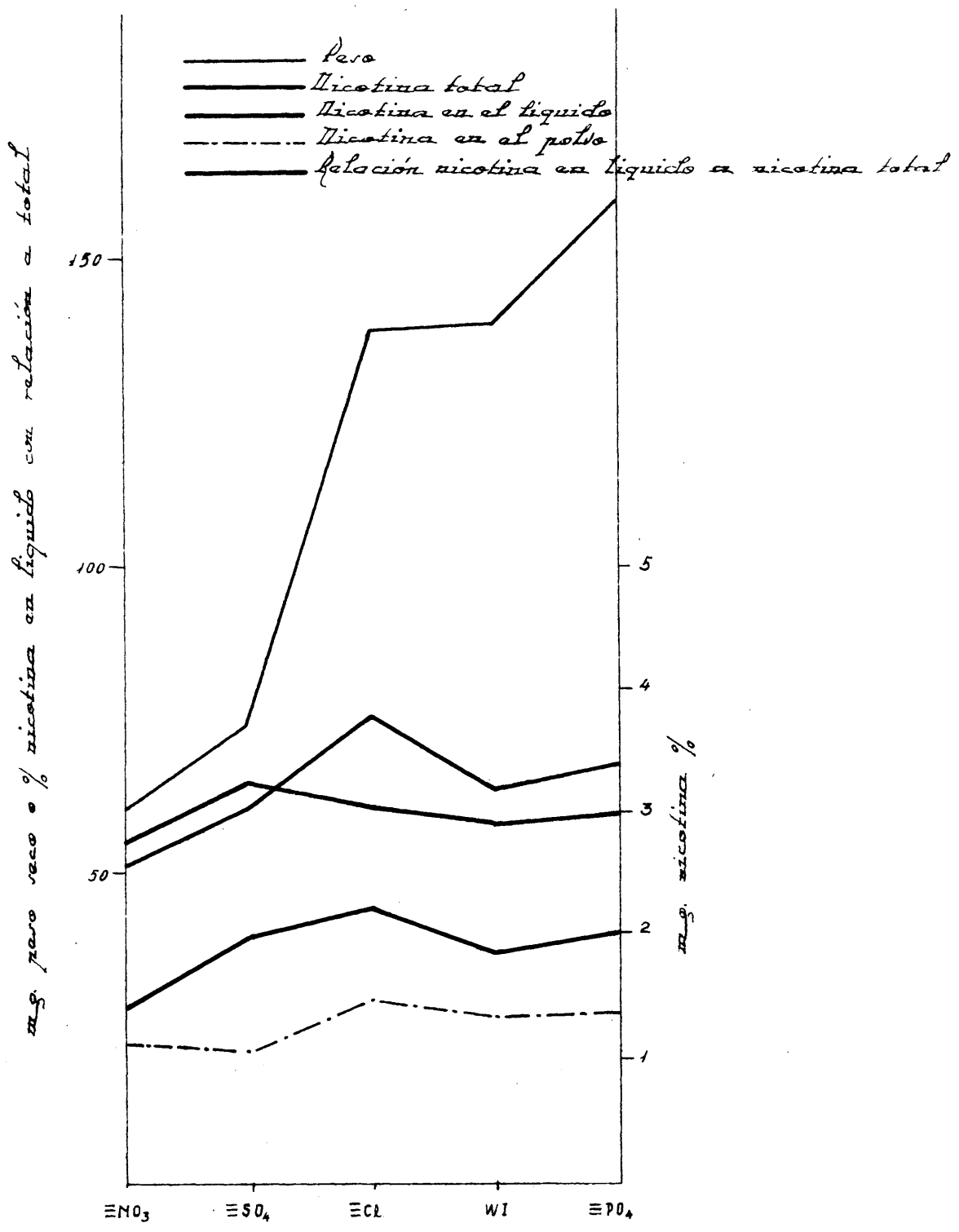
1500

1000

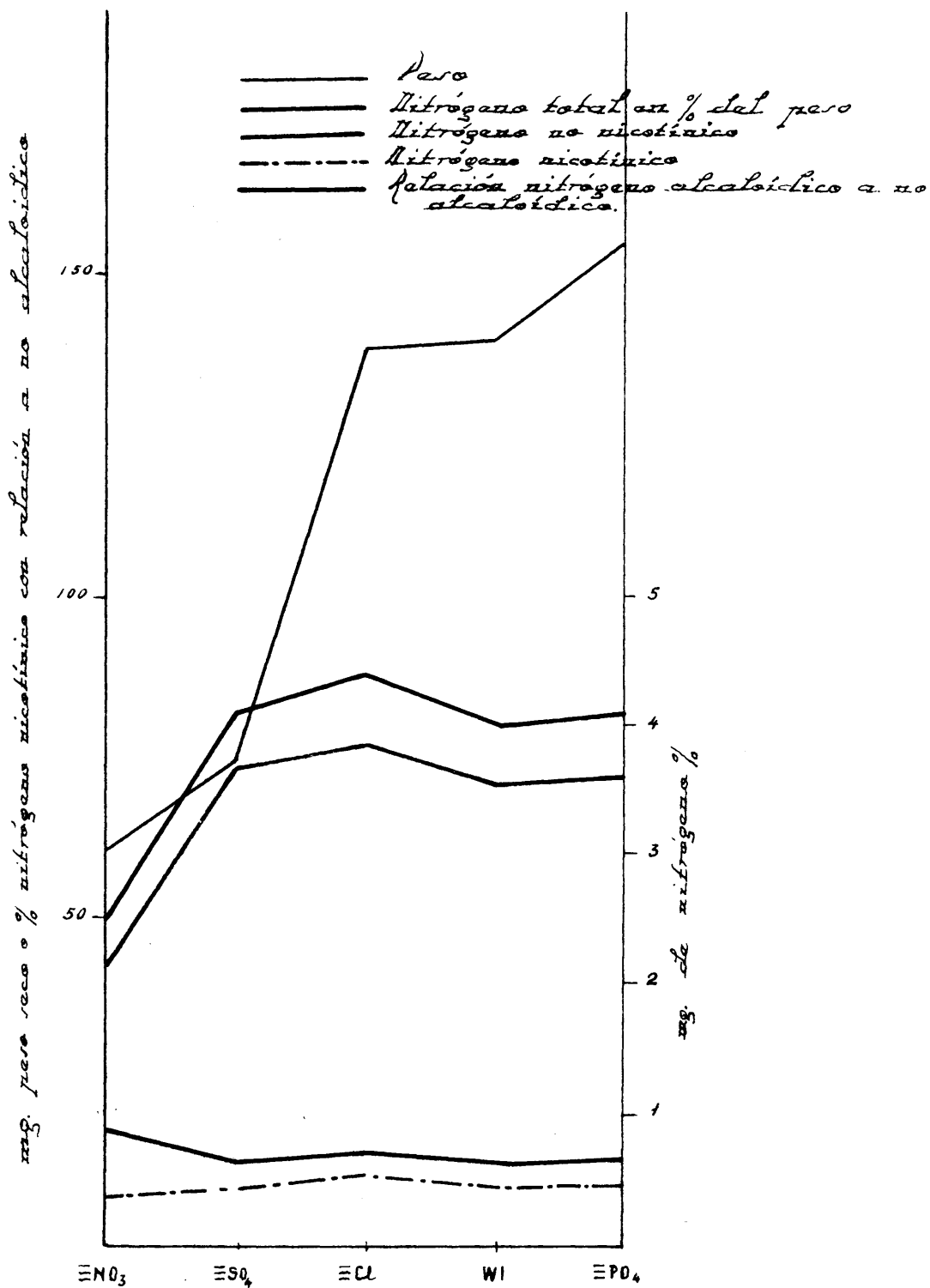
700

400

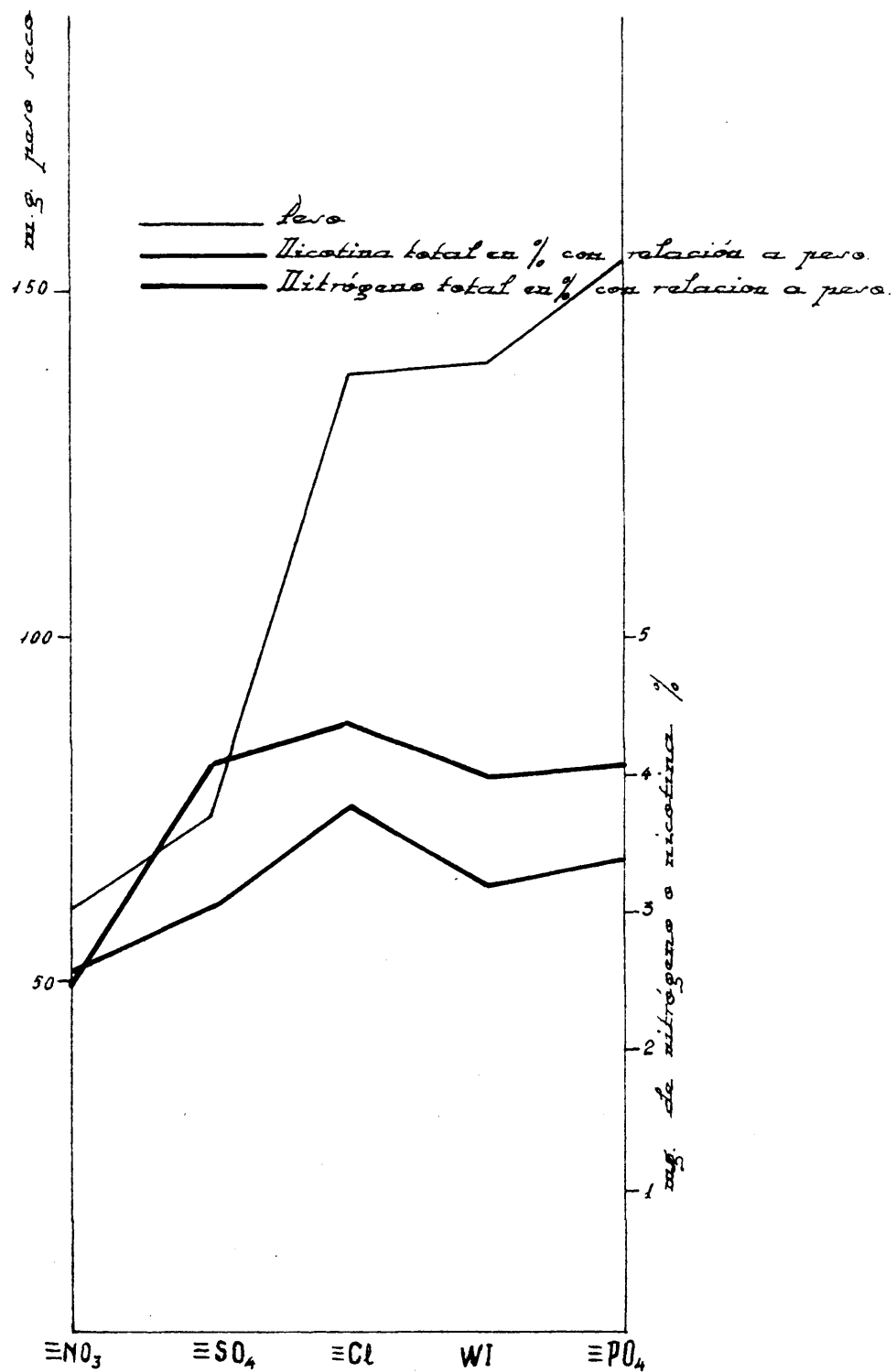
0

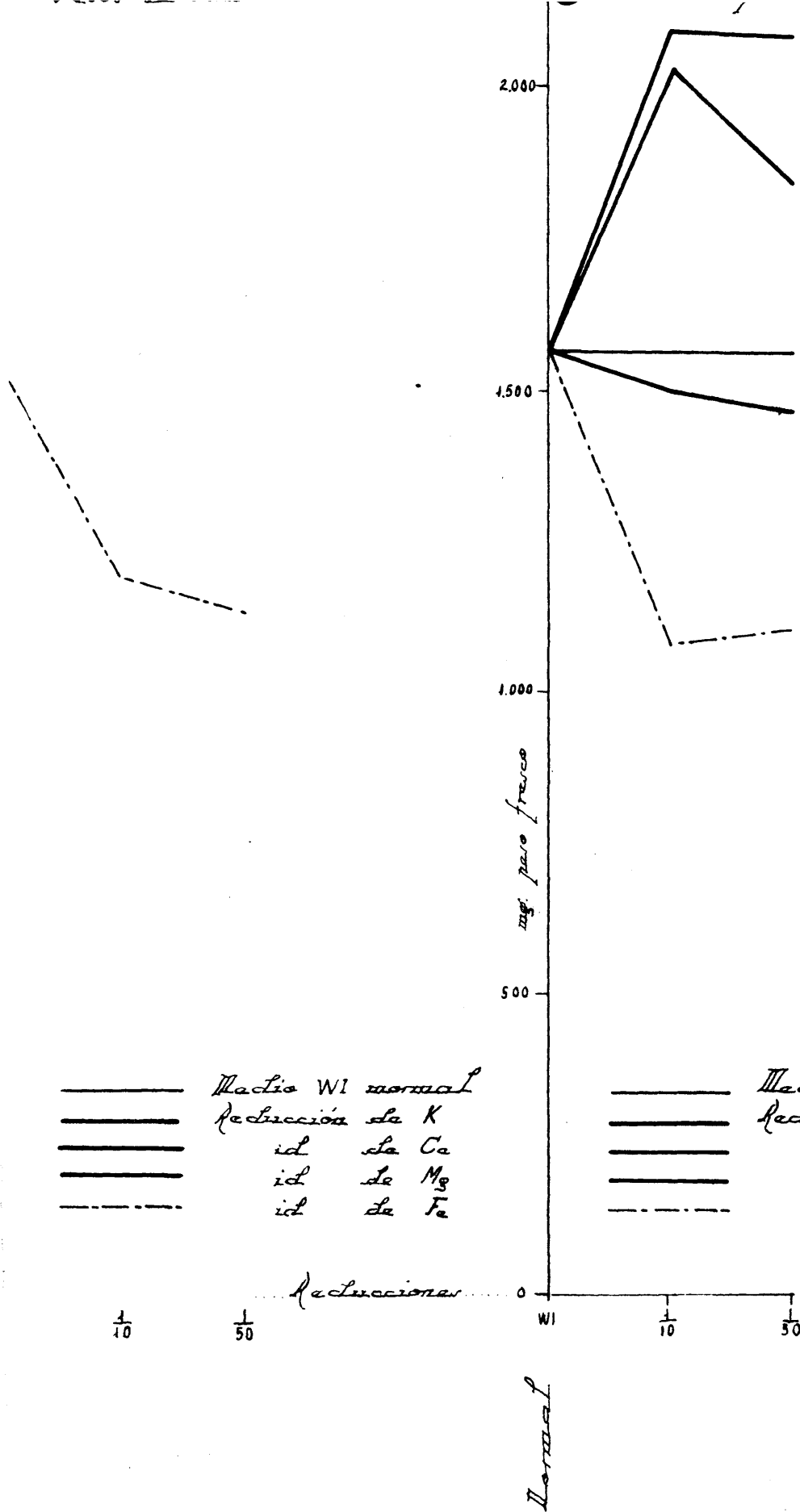


Reducción de azúcares y distribución de nitrógeno



Influencia de la reducción de aniones sobre el contenido en nicotina y nitrógeno.





Medio WI normal

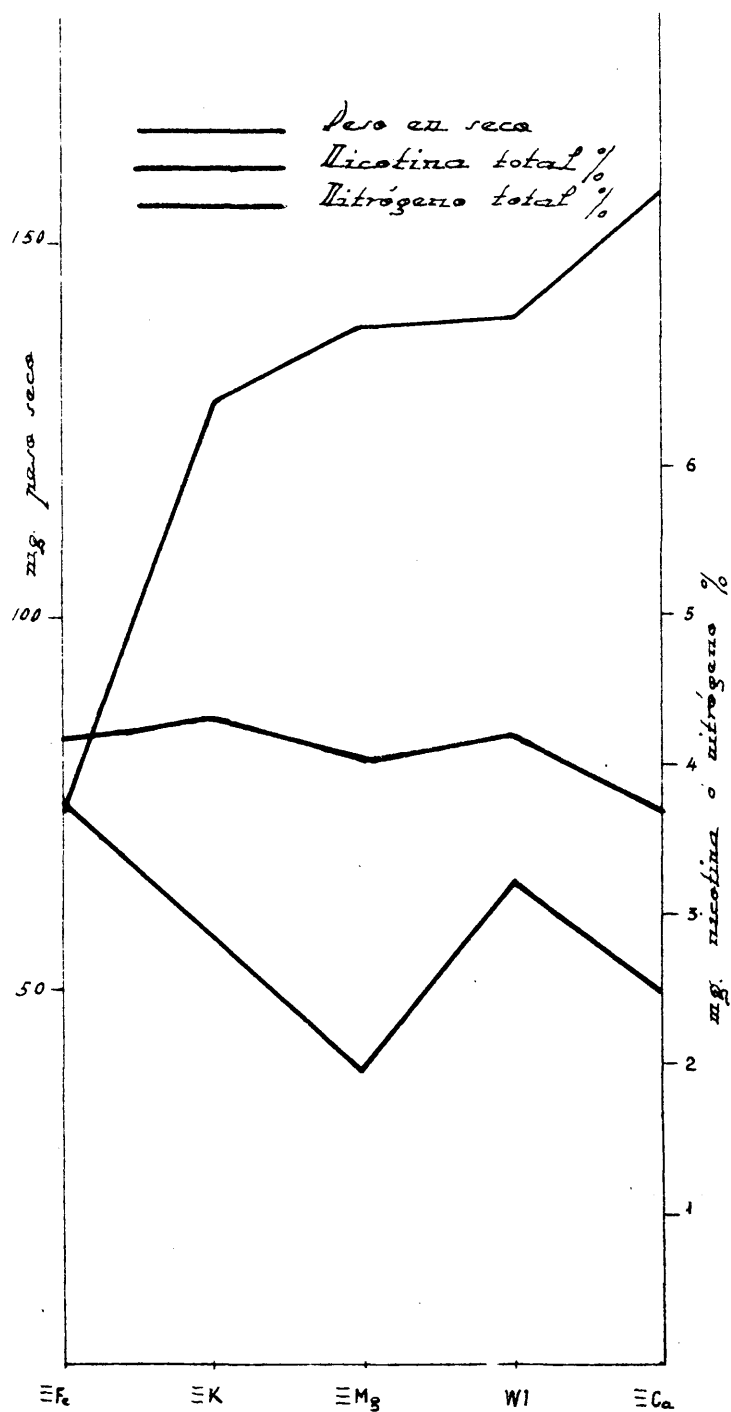
Reducción de K

id de Ca

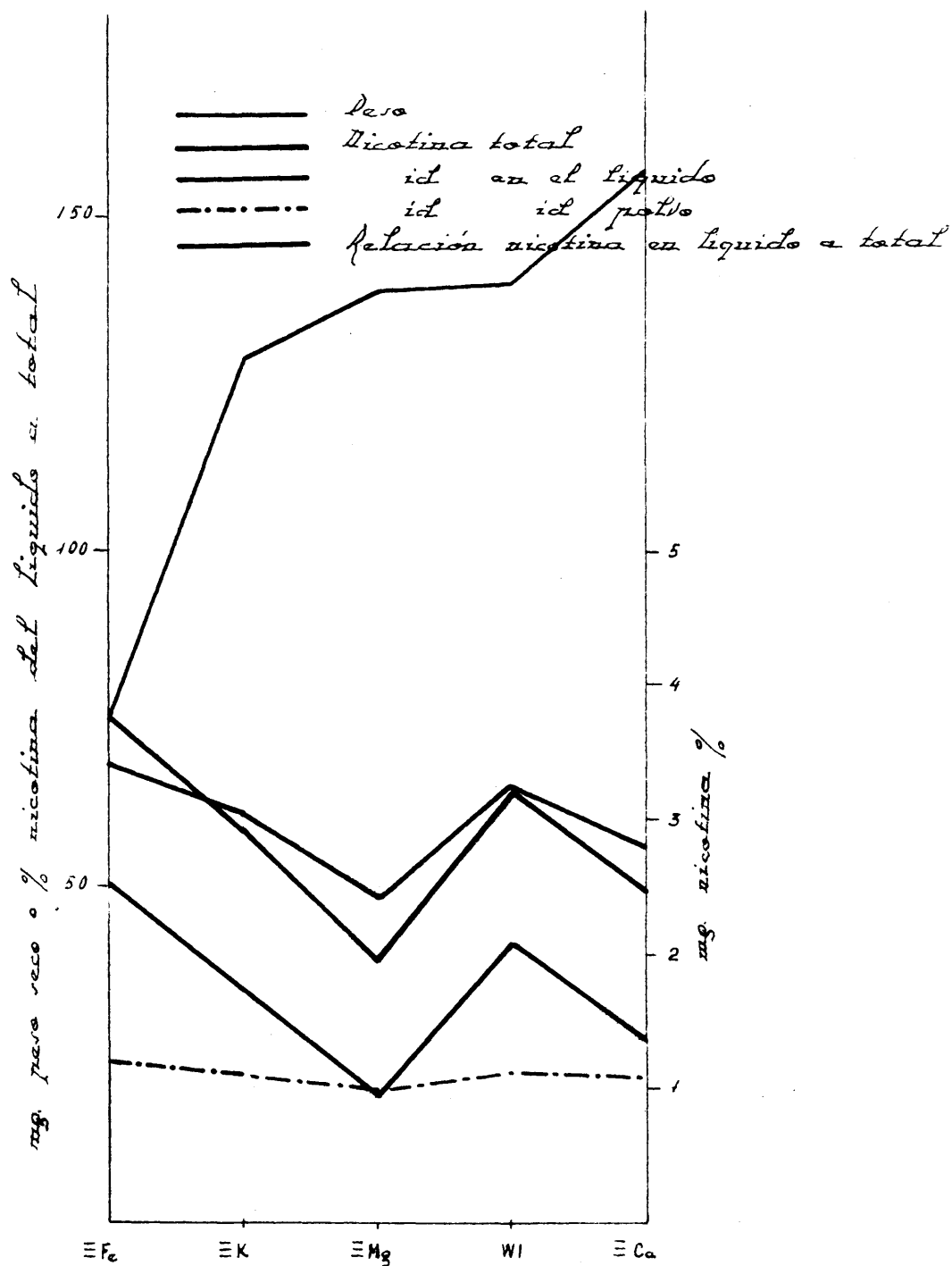
id de Mg

id de Fe

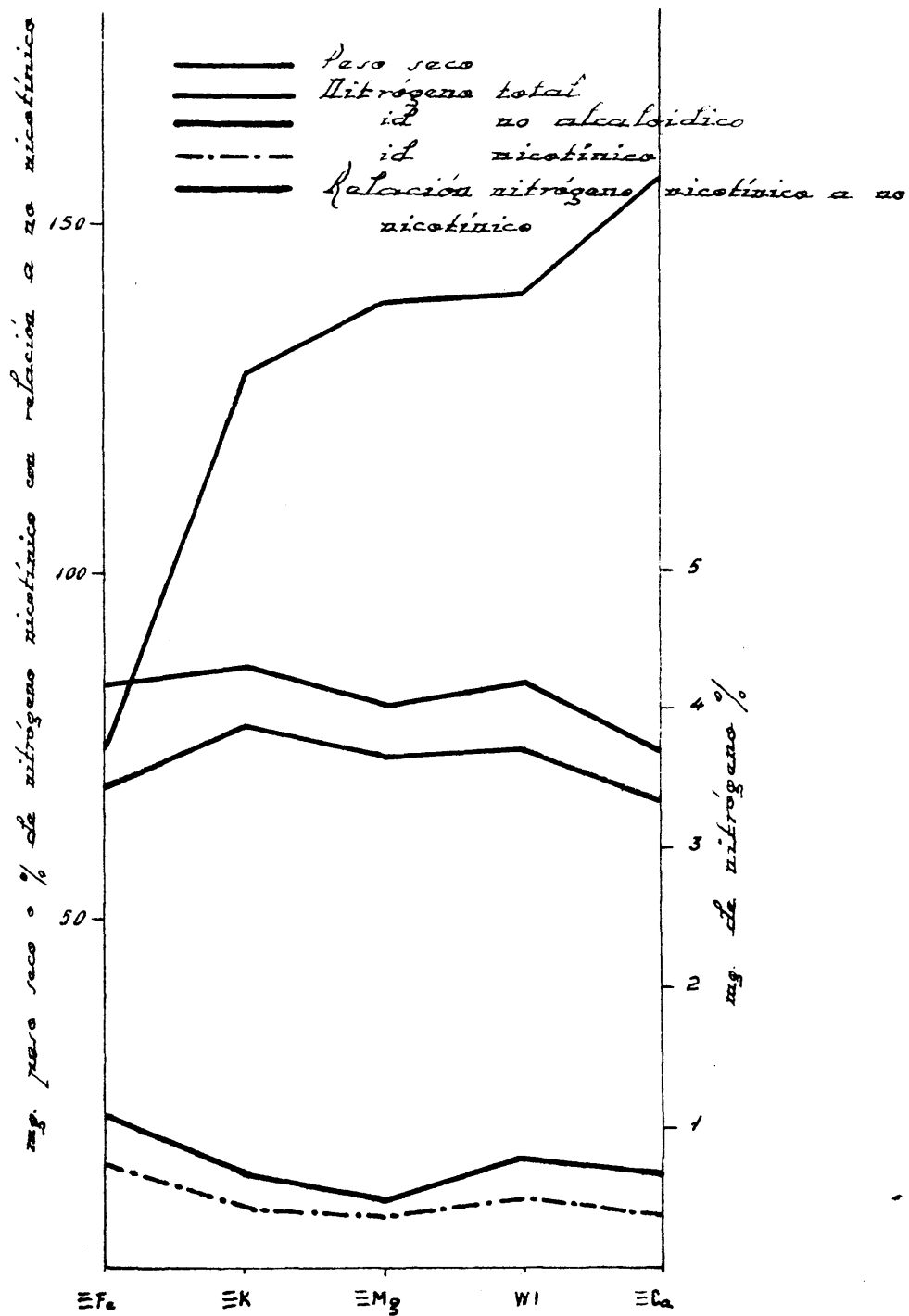
*Influencia de la reducción de cationes sobre
el contenido de nicotina y nitrógeno.*



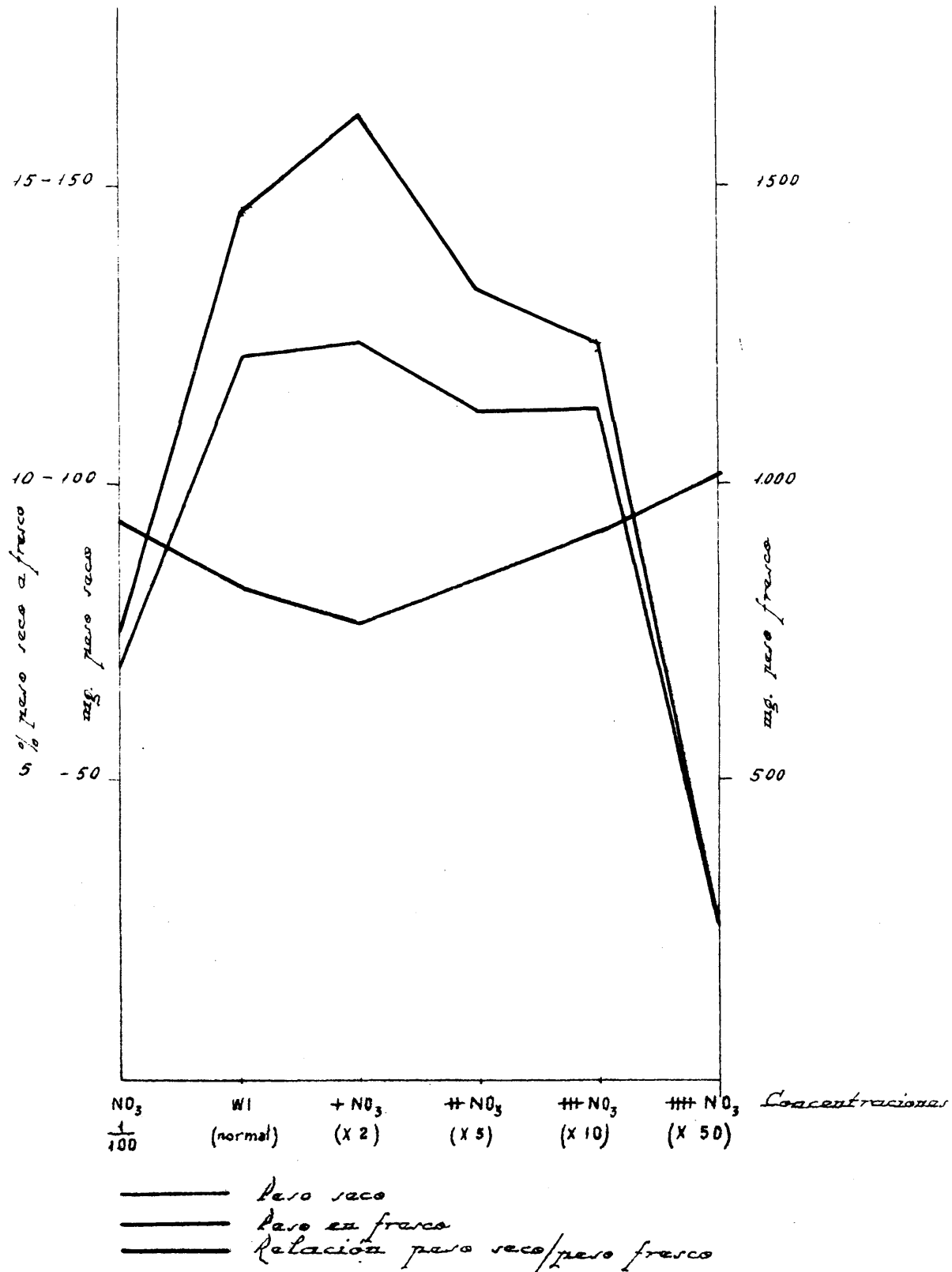
Reducción de cationes y distribución de nicotina



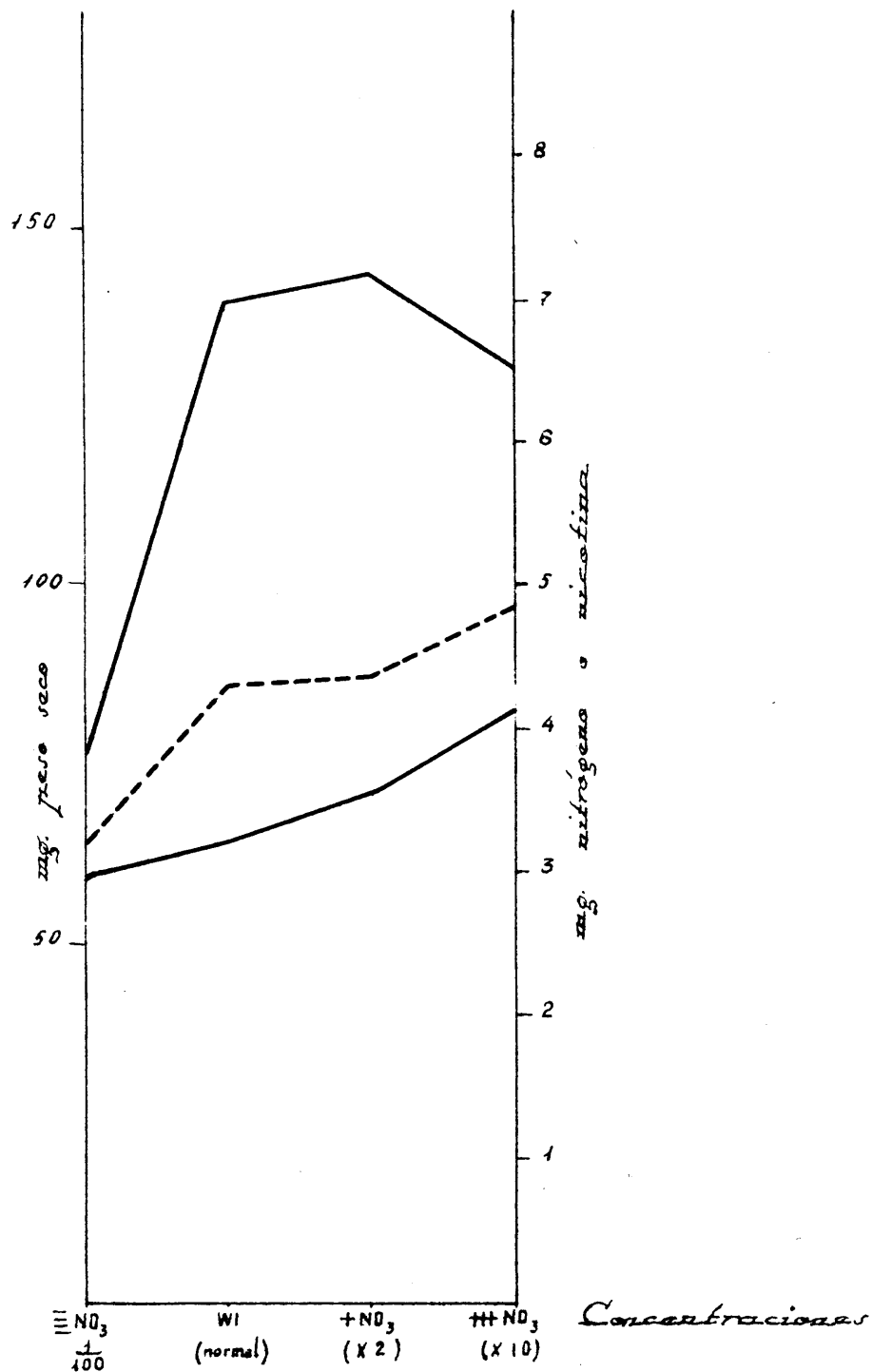
Reducción de raciones y distribución de nitrógeno



Concentración de nitrato y peso.

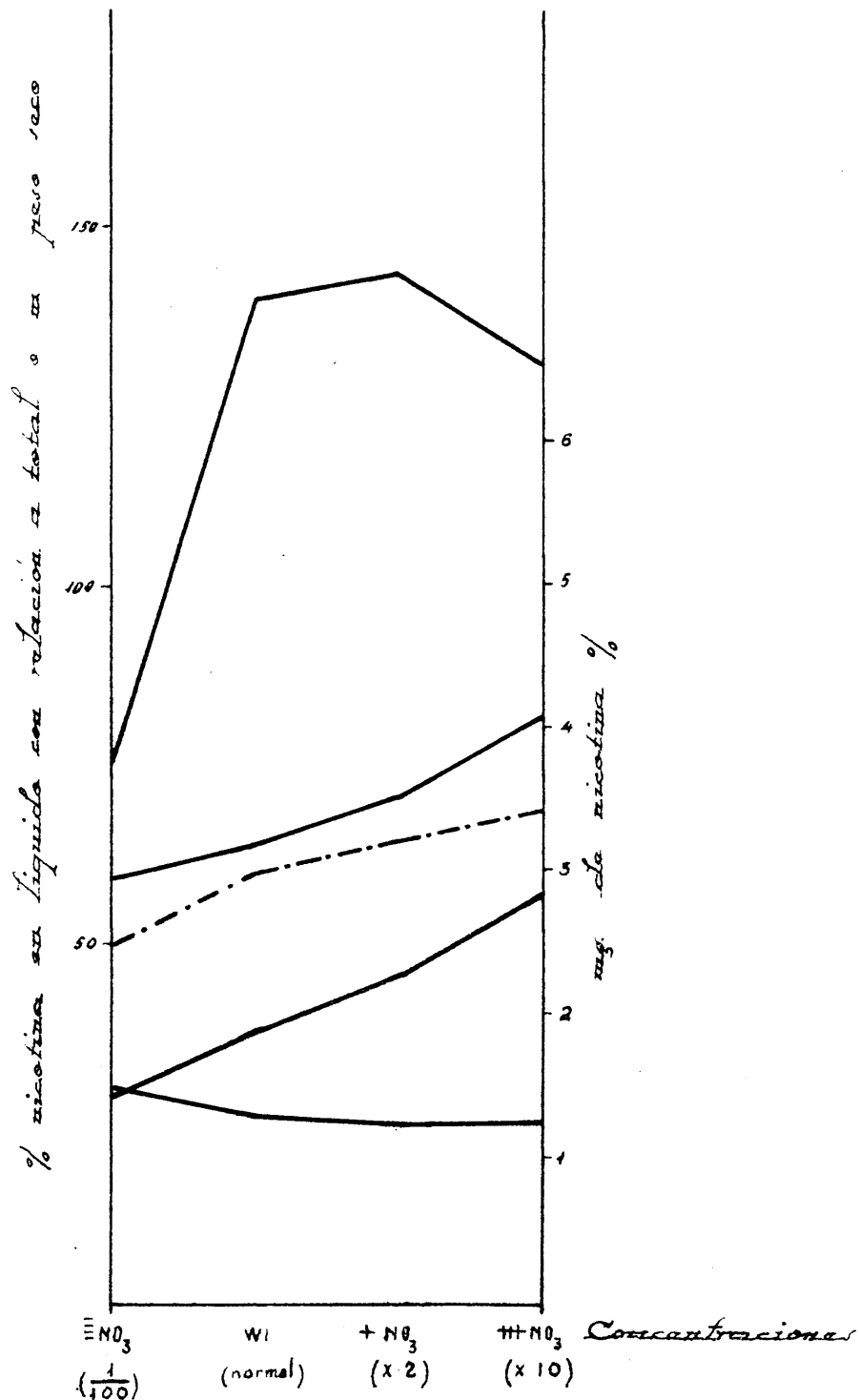


Influencia de la concentración de nitratos sobre peso, formación de nicotina y contenido de nitrógeno.



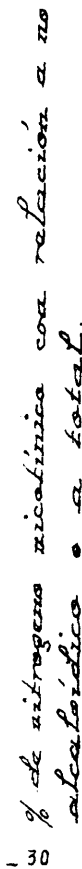
————— Peso
 ————— Nicotina total
 - - - - - Nitrógeno total

Concentración de nitrato y distribución de nicotina



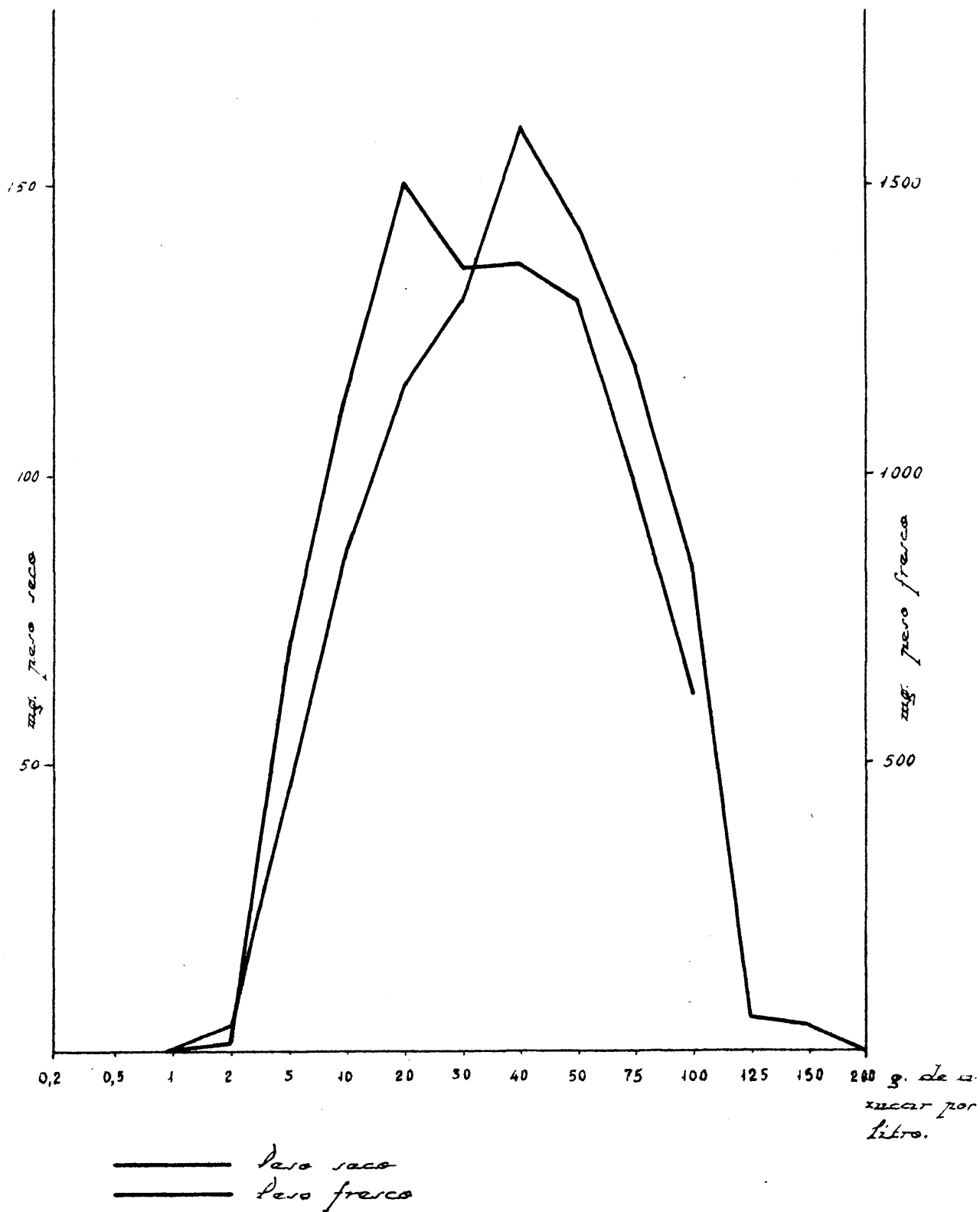
————— Peso
 ————— Nicotina total
 ————— id en liquido
 ————— id en polvo
 -.-.-.- Relación nicotina liquido/nicot. total

πληρωμένο

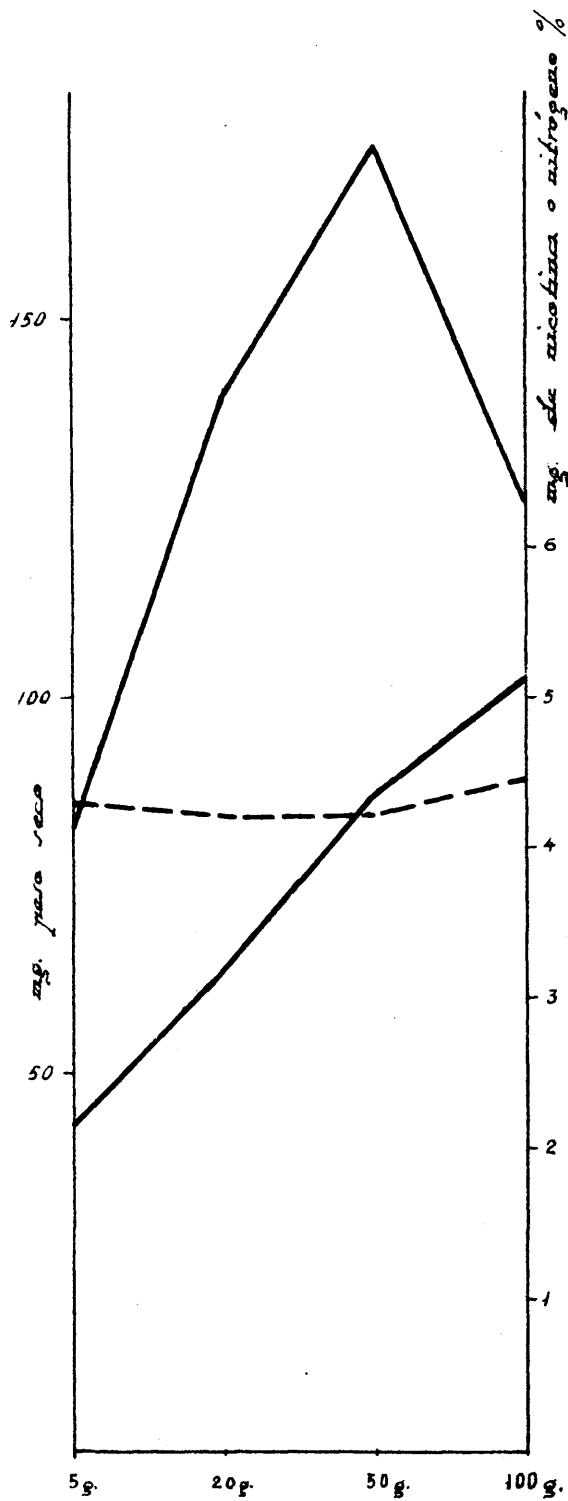


—————	base			
-----	Nitrogeno total			
—————	id	no	alcaloidico	
-----	id	alcaloidico		
—————	Relacion nitrogeno alcaloidico	a	no alcaloidico	
-----	id	id	id	a total

Influencia de la concentración de sacarosa sobre el desarrollo.

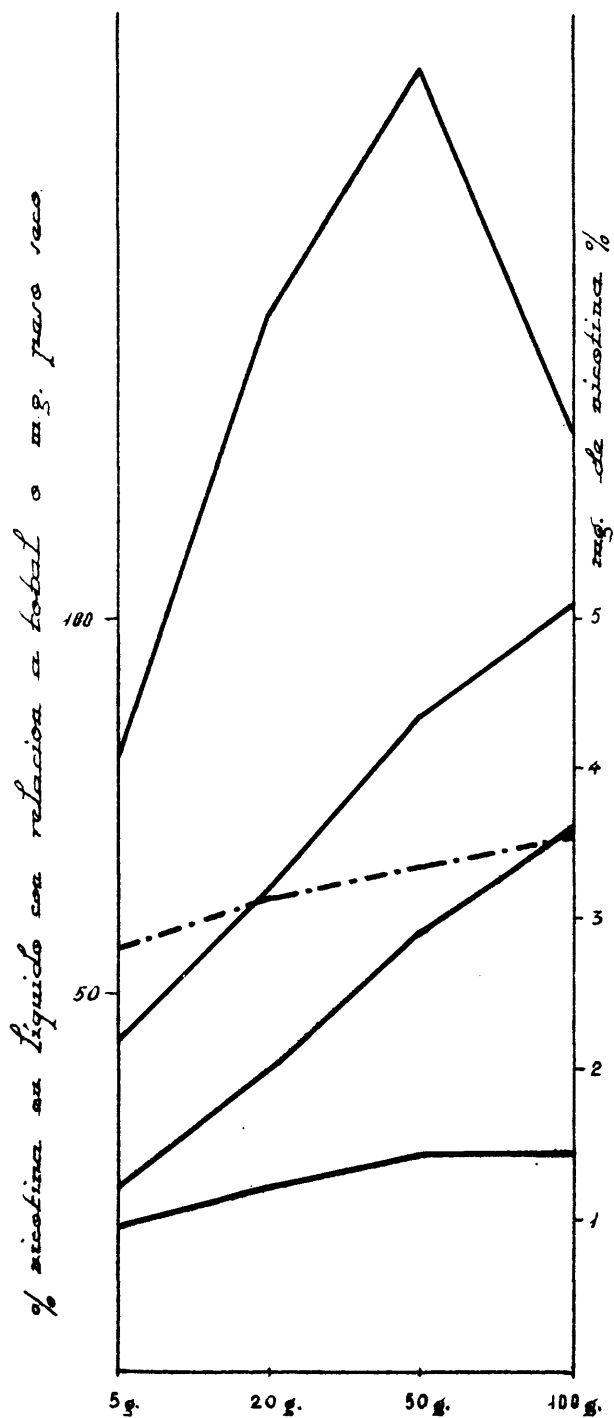


*Influencia de la concentración de sacarosa sobre
 peso, nicotina y nitrógeno totales.*



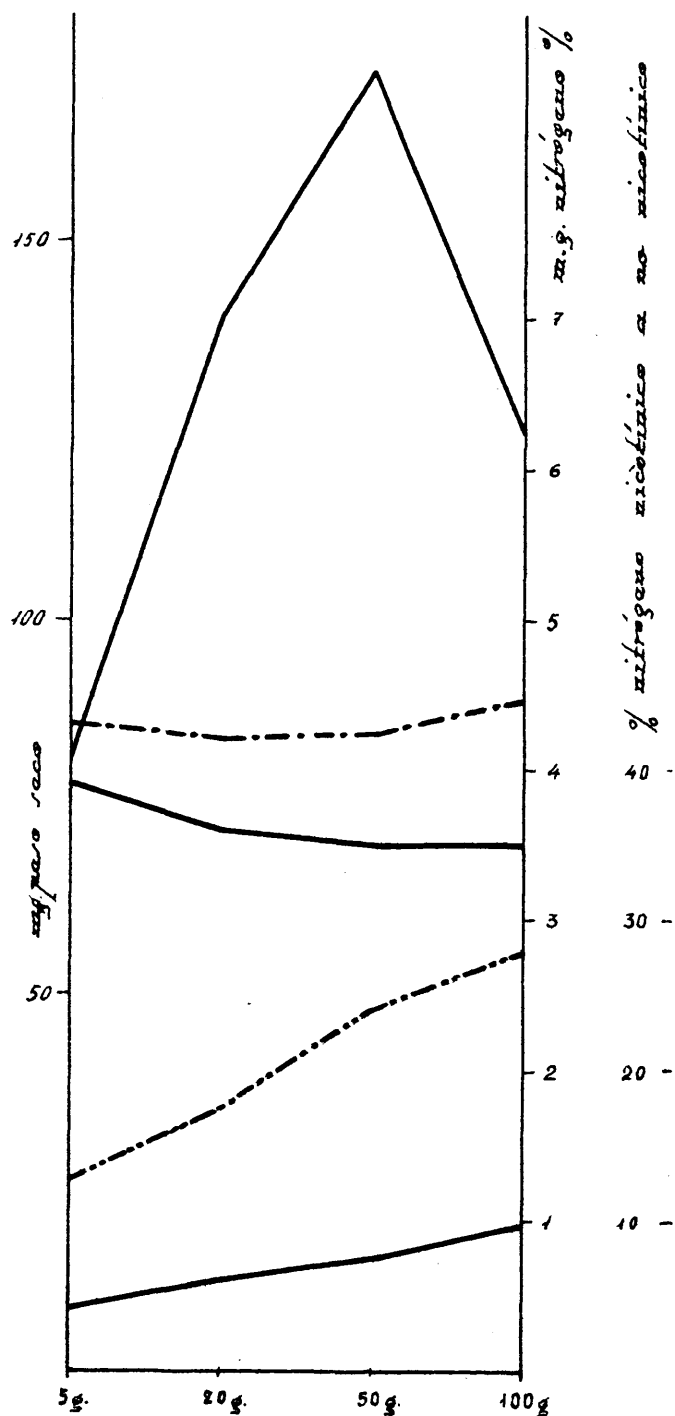
————— peso seco
 - - - - - Nitrógeno total.
 ————— Nicotina total

Concentración de sacarosa y distribución de nicotina







- Peso
- Nicotina total
- id en el líquido
- id en total
- relación nicotina líquido a total

Concentración de sacarosa y distribución de nitrógeno



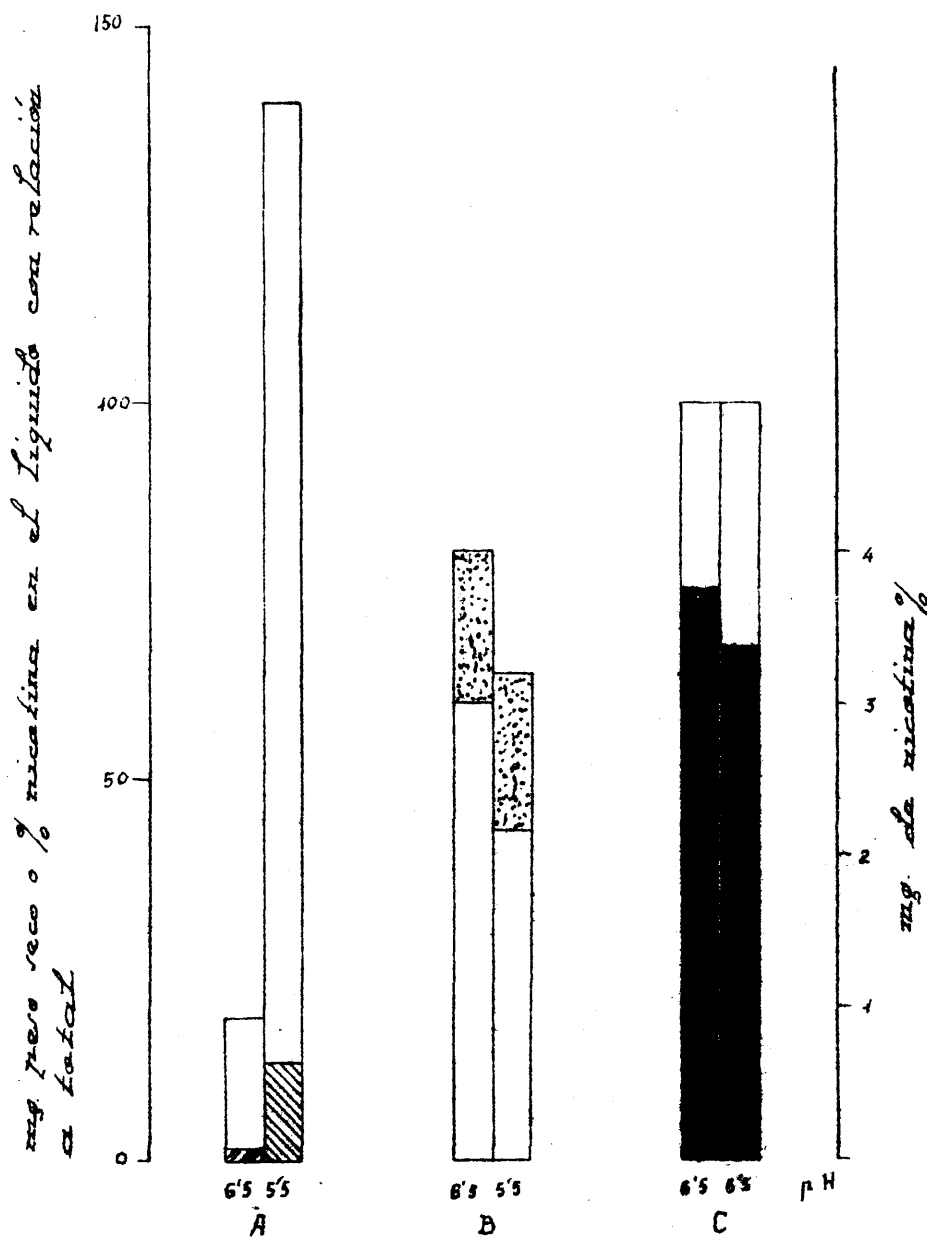
- Pero seco
- - - - - Nitrógeno total
- id no alcaloídico
- Relación nitrógeno alcaloídico a no alcaloídico
- Nitrógeno alcaloídico


A.- Puros en seco   } Puros reales sobre puros reducidos a tástigo común



B.- Nicotina  En el polvo
 En el líquido

C.- Relación $\frac{\text{nicotina en el líquido}}{\text{nicotina total}}$

 Nicotina del líquido sobre nicotina total = 100





A.-Pesar en seco  } Para restar sobre reducir a turgido común a todas las experiencias.

B.-Nicotina  En el polvo
 En el líquido

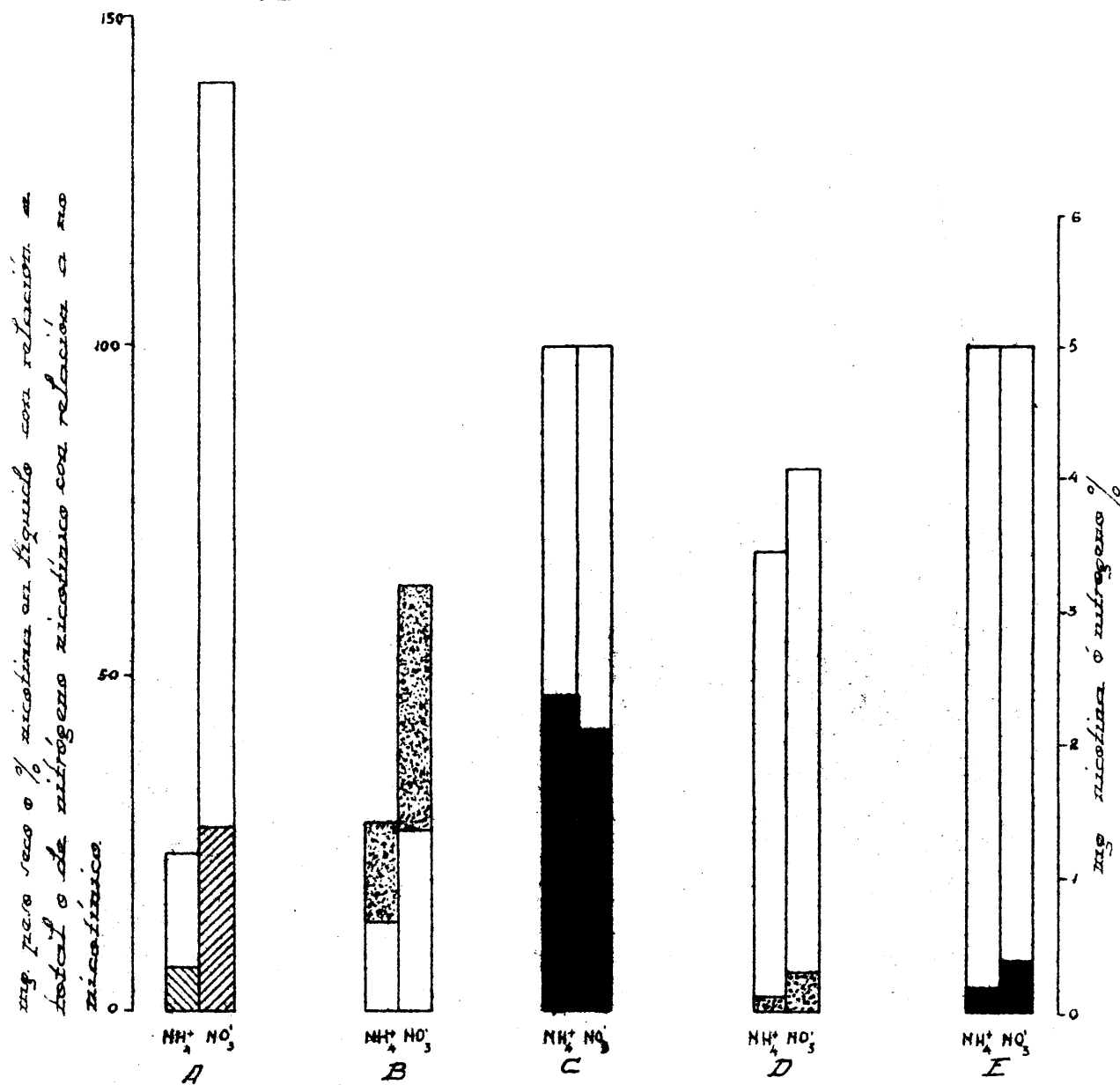
C.-Relación $\frac{\text{nicotina en el líquido}}{\text{nicotina total}}$

 Nicotina en el líquido sobre nicotina total = 100

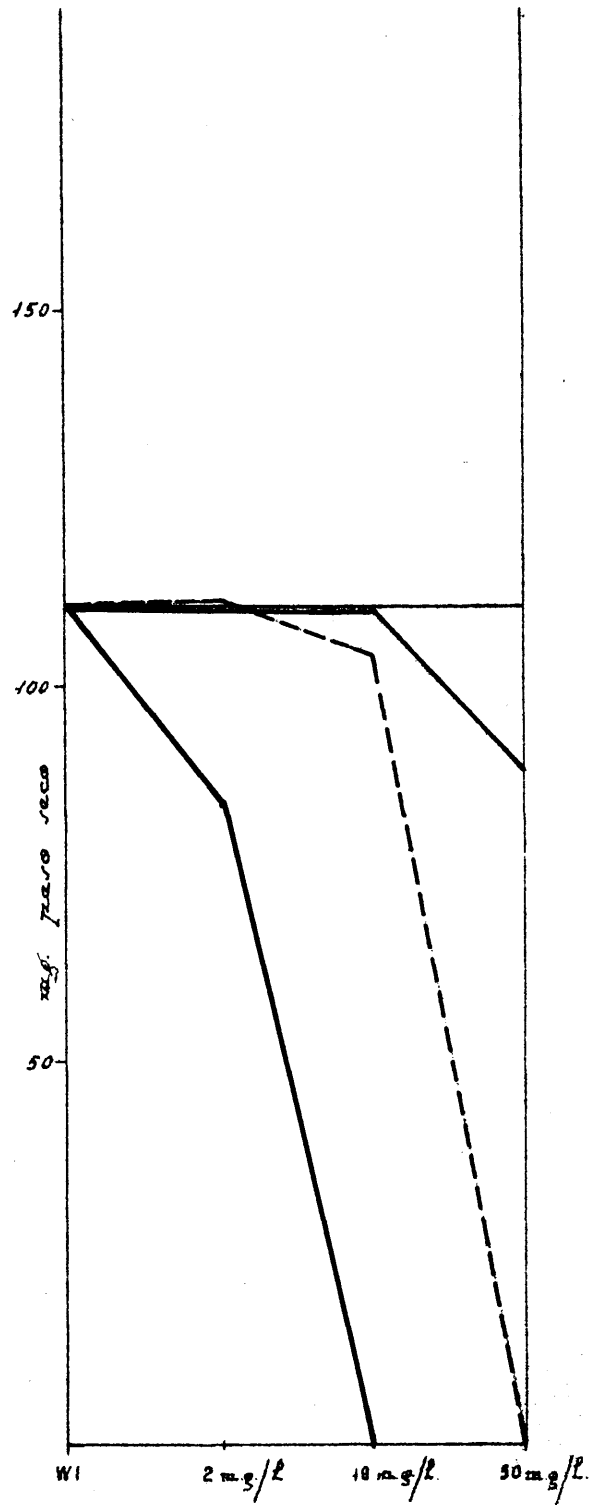
D.-Nitrógeno  Nicotínico
 No nicotínico

E.-Relación $\frac{\text{nitrógeno nicotínico}}{\text{nitrógeno no nicotínico}}$

 Nitrógeno nicotínico sobre no nicotínico = 100

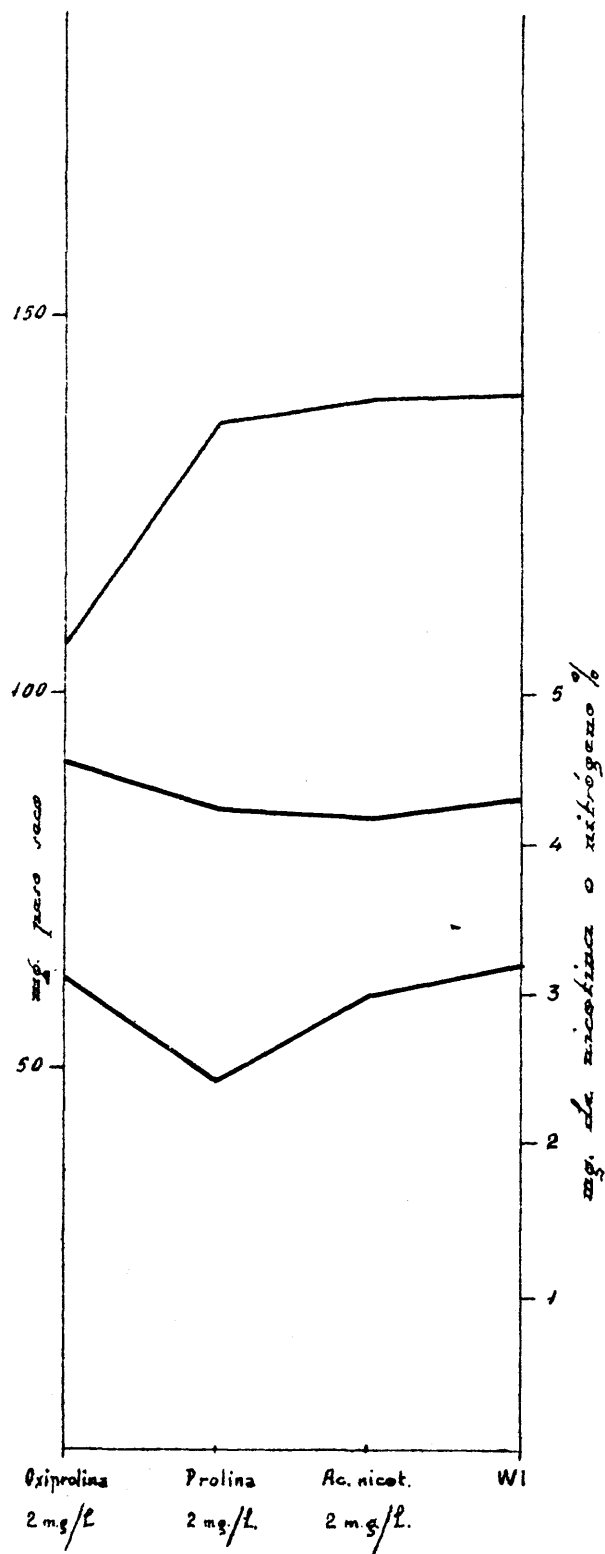


*Influencia del ácido nicotínico, prolina y oxiprolina
sobre el crecimiento.*



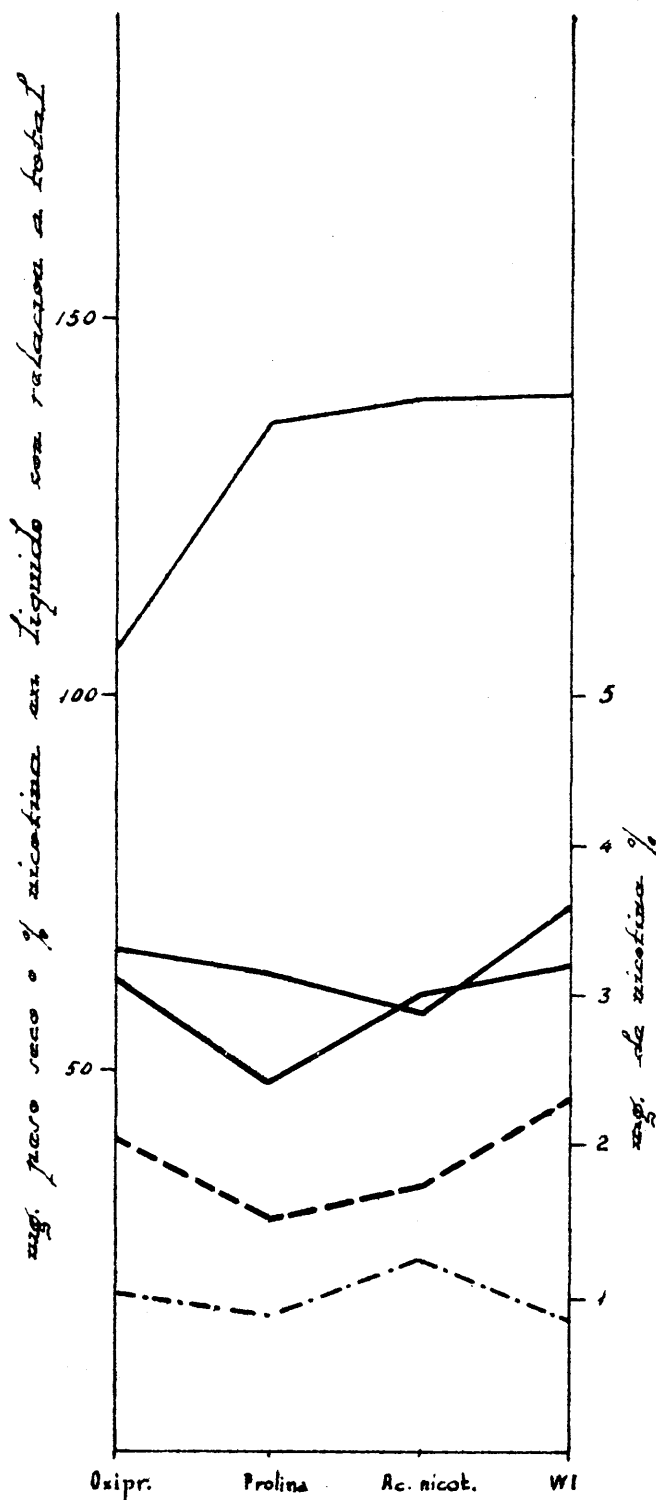
——— W1
 - - - - - Acido nicotínico
 ——— Prolina
 ——— Oxiprolina

sobre peso, nicotina y nitrógeno.



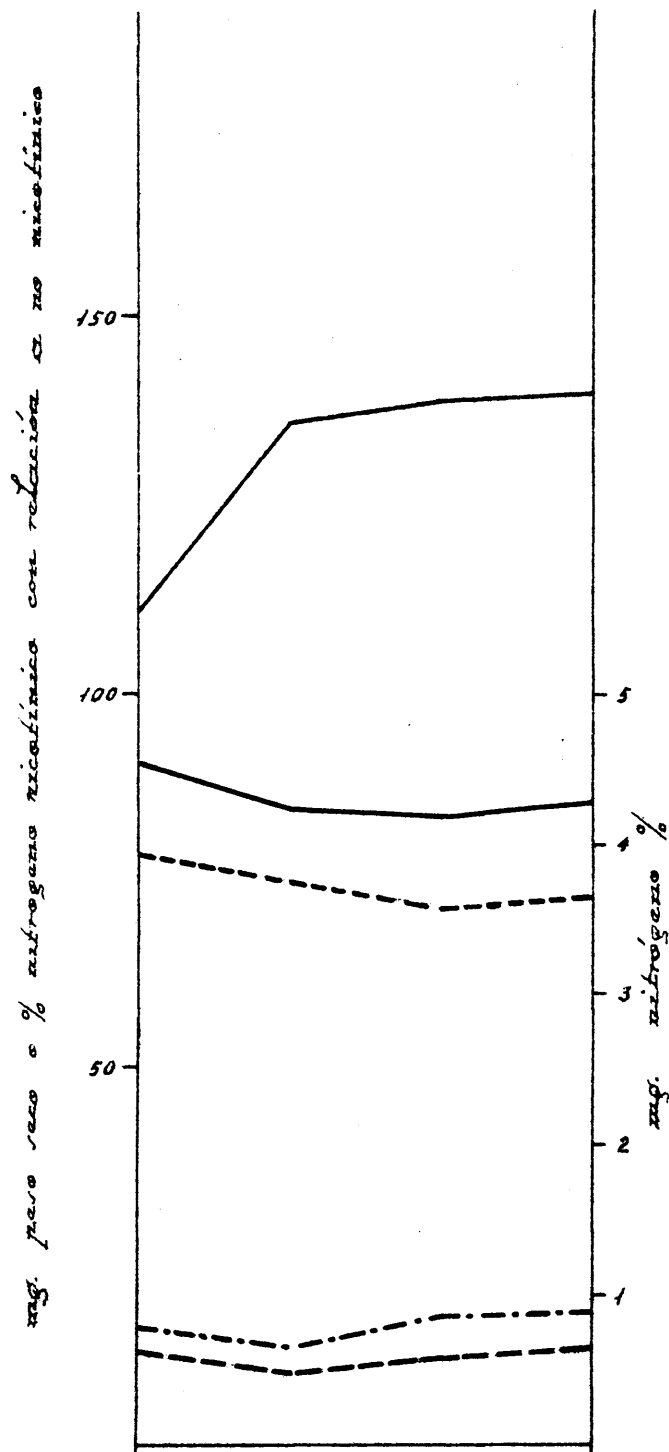
————— Peso
 ————— Nitrógeno total
 ————— Nicotina total

Acido nicotínico, prolina y oxiprolina, y distribución de nicotina



- Puro
- Nicotina total
- id. en el líquido
- .-.-.- id. en polvo
- relación nicotina en el líquido a total

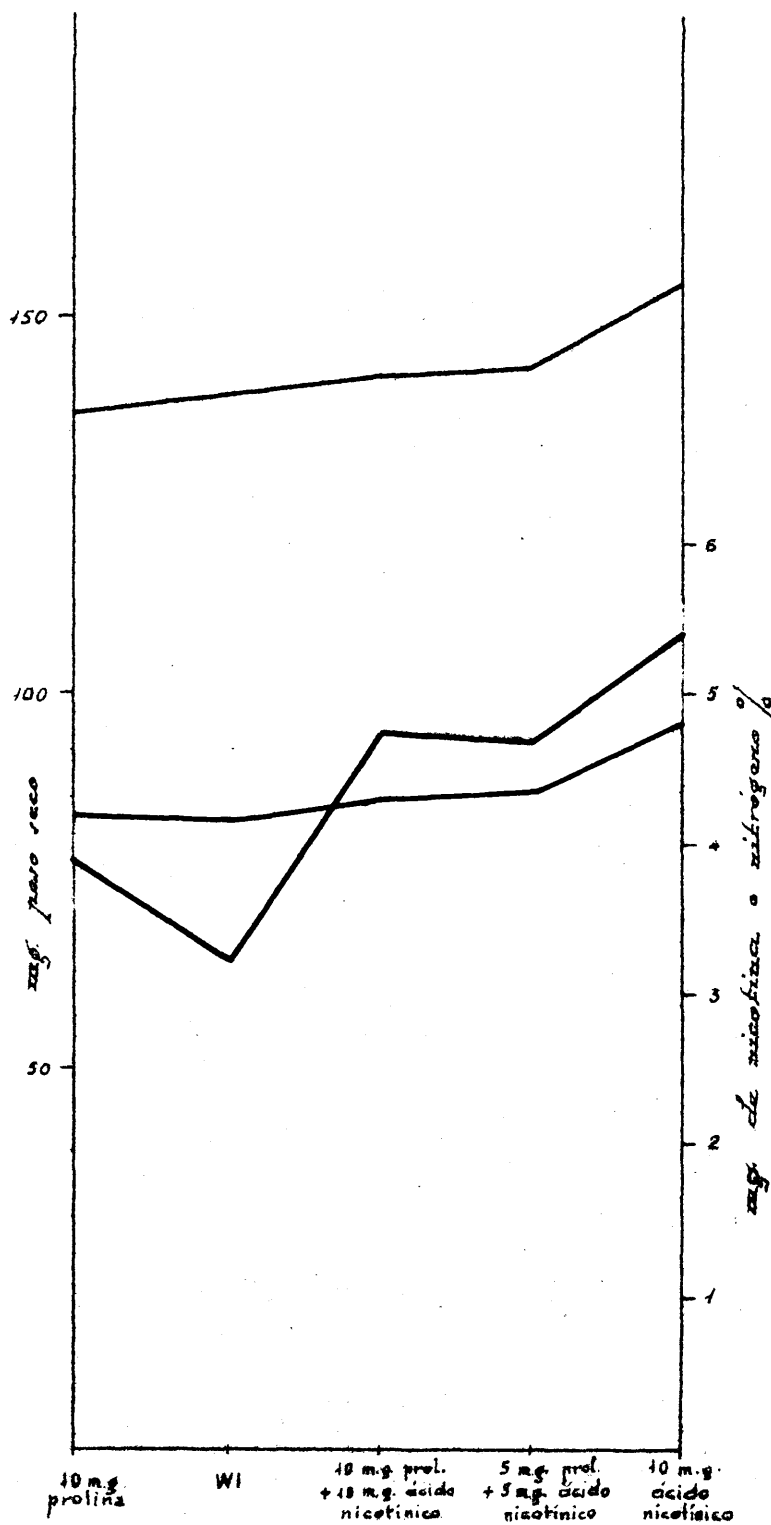
Influencia del ácido nicotínico, prolina y oxiprolina sobre distribución de nitrógeno.



————— Peso
 ————— Nitrógeno total
 - - - - - id. no alcaloidico
 - . - . - id. nicotínico
 Relación nitrógeno nicotínico a no
 nicotínico.

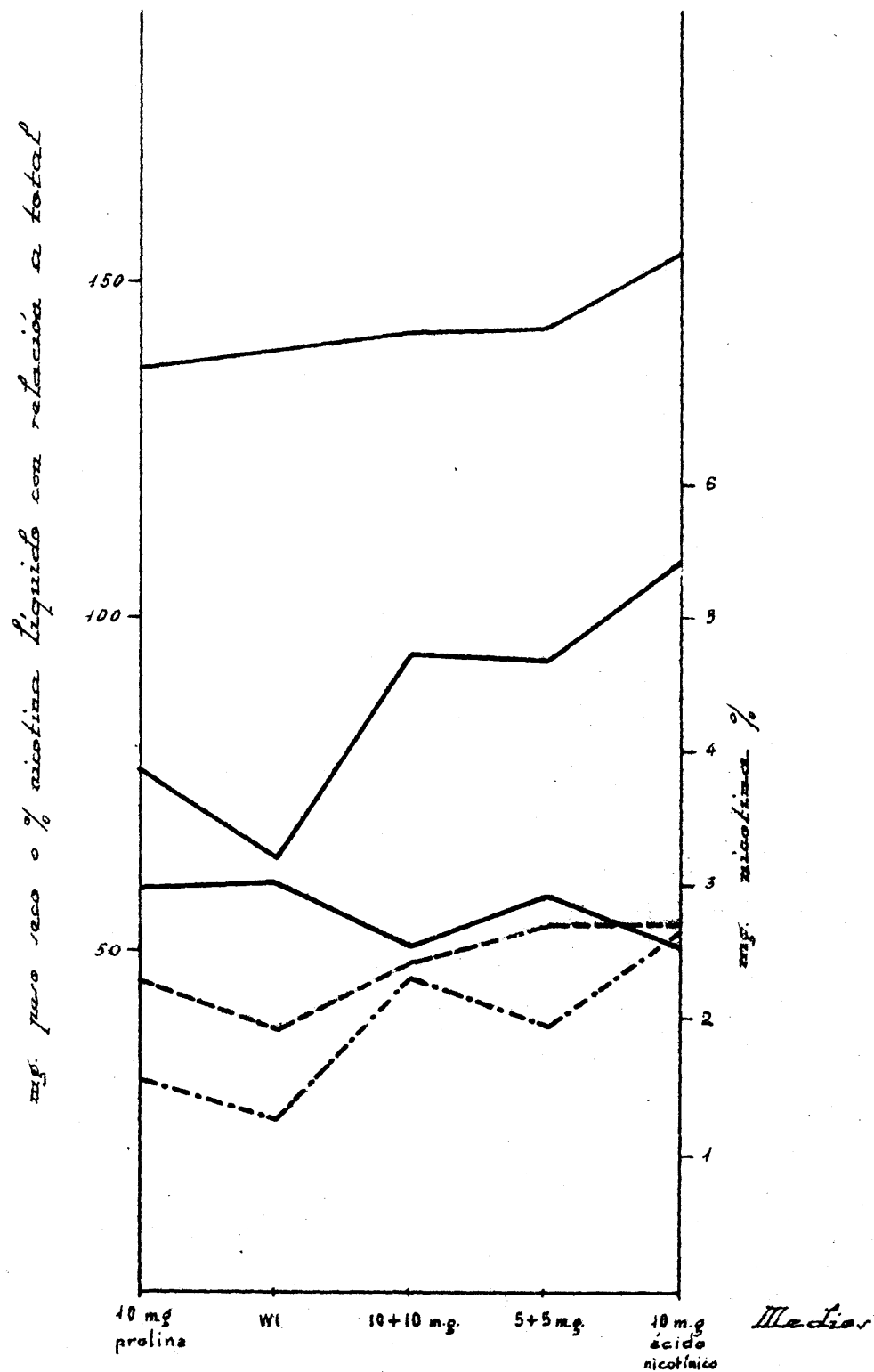
Acción conjunta de ácido nicotínico y prolina.

Acción sobre peso y porcentajes de nicotina y nitrógeno totales.



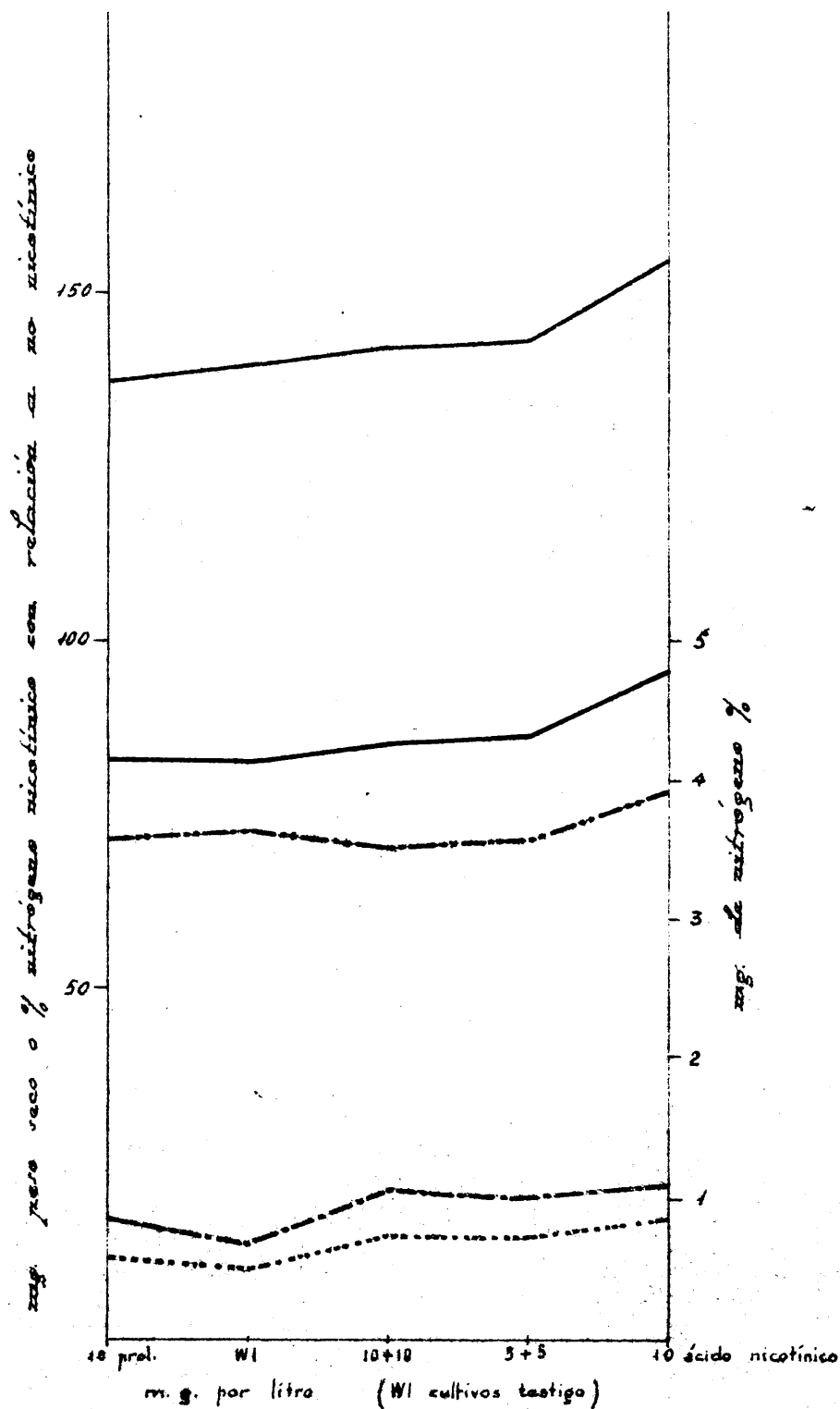
————— *Peso*
 ————— *Nicotina total*
 ————— *Nitrógeno total*

Efecto sobre distribución de nicotina.



- Puro
- Nicotina total
- - - id. en el líquido
- . - id. en polvo.
- relación nicotina líquido a total

Efecto sobre distribución de nitrógeno.



- *Peso*
- *Nitrógeno total*
- *id no alcaloidico*
- *id nicotínico*
- . - . - *Relación nitrógeno nicotínico a no nicotínico*